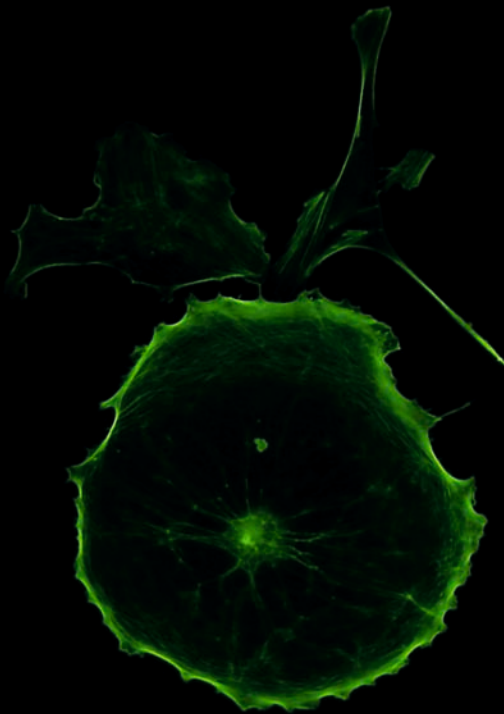


Morphologische, funktionelle und parakrine Aspekte kardialer Primärkulturen und deren Beeinflussung durch Veränderungen des Umgebungsmilieus

SANDRA SCHEUFEN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. J. Roth
und
dem Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: PD Dr. S. Wenzel

**Morphologische, funktionelle und parakrine Aspekte
kardialer Primärkulturen und deren Beeinflussung
durch Veränderungen des Umgebungsmilieus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sandra Scheufen
Tierärztin aus Neumünster

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter/-in: Prof. Dr. J. Roth
PD Dr. S. Wenzel

Tag der Disputation: 27.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Darstellungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Regeneration und Bedeutung der Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Beschreibung der für diese Studie relevanten Zelltypen.....	4
1.2.1 Stammzellen und Progenitorzellen.....	4
1.2.2 Fibroblasten.....	6
1.2.3 Endothelzellen.....	7
1.2.4 Kardiomyozyten.....	9
1.2.5 Zellen dieser Studie.....	11
1.3 Zytokine und ihre Wirkungen	12
1.4 Hypoxie	13
1.5 Zellkulturverfahren	17
1.6 Fragestellung	19
2. Material.....	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Lösungen, Medien und Puffer	22
2.3 Antikörper.....	27
2.4 Primer	28
2.5 Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	29
2.6 Verbrauchsmaterial.....	32
2.7 EDV.....	32
3. Methoden.....	34
3.1 Studiendesign und Herkunft des Zellmaterials.....	34
3.2 Patientendaten.....	35
3.3 Kultivierung der Zellen und Gewinnung konditionierter Überstände	37
3.4 Charakterisierung und Dokumentation der Zellmorphologie	41
3.4.1 Phasenkontrastmikroskopie	41
3.4.2 Untersuchung der Zelllinien auf Zellmarker und strukturelle Proteine	42
3.4.2.1 Probenvorbereitung	42
3.4.2.2 SDS-PAGE und Western Blot.....	43
3.4.2.3 Detektion der Proteine	45
3.4.3 Untersuchung der Zelllinien auf mRNA-Ebene.....	46
3.4.3.4 Vorbereitung der Proben.....	46

3.4.3.5 RNA Isolierung über Phenol-Chloroformextraktion	46
3.4.3.6 Bestimmung der RNA-Konzentration	47
3.4.3.7 cDNA Synthese.....	47
3.4.3.8 RT-PCR	48
3.4.3.9 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Amplifikate	49
3.4.4 Magnetische Zellseparierung	50
3.4.5 Differenzierung	52
3.4.6 Immunfluoreszenz	53
3.5 Beschreibung der durchgeführten Versuche.....	55
3.5.1 Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten des Rattenherzens.....	55
3.5.2 Kultivierung isolierter Kardiomyozyten.....	56
3.5.3 Inkubation der Kardiomyozyten mit standardisierten Proben	57
3.5.4 Messung der relativen Zellverkürzung im elektrischen Feld	58
3.5.5 Bestimmung der Zellverkürzungsparameter und statistische Auswertung	60
3.5.6 Induktion einer Hypoxie durch Veränderungen des Umgebungsmilieus ..	61
3.5.7 Zytokinarray.....	63
3.6 Statistik	65
4. Ergebnisse.....	66
4.1 Kultivierungsverfahren und Morphologie der kultivierten Zellen.....	66
4.2 Charakterisierung der CFC und CDC.....	76
4.2.1 Western Blot.....	76
4.2.2 PCR.....	79
4.2.3 Differenzierungsversuch	84
4.2.4 Immunfluoreszenz	87
4.2.5 Zellverkürzungsmessungen – funktionelle Charakterisierung	89
4.3 Hypoxieversuche	90
4.3.1 Untersuchung der CFC/CDC auf Transkriptionsebene.....	90
4.3.2 Untersuchung der Zellverkürzung ventrikulärer Kardiomyozyten	94
4.3.3 Untersuchung der konditionierten Überstände im Zytokinarray	97
5. Diskussion	104
5.1 Beurteilung der Kultivierungsverfahren	104
5.2 Beurteilung der Charakterisierung	107
5.3 Beurteilung der Hypoxieversuche	111
5.4 Schlussfolgerung	115
6. Zusammenfassung	116
Summary	117
Literaturverzeichnis	118

Darstellungsverzeichnis

Darst. 1 Sterbefälle (absolut) für die 10 häufigsten Todesursachen	3
Darst. 2 Übersicht Patientendaten und Probenmaterial	37
Darst. 3 Elektrophoretische Auftrennung PCR-Produkte FSP1 (161bp)	50
Darst. 4 Prozesse während der Kultivierung nach Messina et.al	66
Darst. 5 Prozesse während der Kultivierung nach Barile et al.	66
Darst. 7 Runde Zellen mit hohem Kern-/Zytoplasmaverhältnis	67
Darst. 8 Gleiche Lokalisation wie Darst.7	67
Darst. 6 Übersicht zum zeitlichen Verlauf der Kultivierung in Wochen	67
Darst. 9 Primärkultur 23 Tage nach Anlegen, hell leuchtende Zellen (CFC)	68
Darst. 10 Fibroblastenartige und hell leuchtende Zellen vier Tage nach Trypsinierung	68
Darst. 11 Primärkultur 27 Tage nach Anlegen, endothelzellartige Zellen im Kopfsteinpflastermuster	68
Darst. 12 Zelllinie sechs Tage nach Trypsinierung	68
Darst. 13 Primärkultur 29 Tage nach Anlegen	69
Darst. 14 Primärkultur 29 Tage nach Anlegen	69
Darst. 15 Dieselbe Primärkultur wie in Darst.14	69
Darst. 16 Dieselbe Primärkultur wie in Darst.14 und 15	69
Darst. 17 Übersicht Kardiosphärenbildung	70
Darst. 18 Primärkultur 29 Tage nach Anlegen	71
Darst. 19 Zelllinie elf Tage nach Trypsinierung	71
Darst. 20 Zelllinie vier Tage nach Trypsinierung	71
Darst. 21 Zelllinie acht Tage nach Trypsinierung	71
Darst. 22 CDC einen Tag nach Ausplattieren der Kardiosphäre	72
Darst. 23 CDC einen Tag nach Ausplattieren der Kardiosphäre	72
Darst. 24 CDC elf Tage nach Ausplattieren der Kardiosphäre	72
Darst. 25 CDC 14 Tage nach Ausplattieren der Kardiosphäre	72
Darst. 26 c-Kit selektierte Zellen vier Tage nach magnetischer Separierung	73
Darst. 27 c-Kit selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung	73
Darst. 28 sca-1 selektierte Zellen vier Tage nach magnetischer Separierung	73
Darst. 29 sca-1 selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung	73
Darst. 30 c-Kit selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung (2)	74
Darst. 31 sca-1 selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung (2)	74
Darst. 32 negative Selektion vier Tage nach magnetischer Separierung	74
Darst. 33 negative Selektion 14 Tage nach magnetischer Separierung	74
Darst. 34 Fibroblasten der Maus, einen Tag nach Erhalt	75
Darst. 35 Humane Fibroblasten aus Lungenge-fäßen zwei Tage nach Trypsinierung	75
Darst. 36 kardiale Endothelzellen der Ratte fünf Tage nach Ausplattieren	76
Darst. 37 HUVECs fünf Tage nach Erhalt	76
Darst. 38 Übersicht Zelllinien und Herzgewebe untersucht im Western Blot	77
Darst. 39 Übersicht der Western Blot Banden	78
Darst. 40 relative mRNA-Expression von c-Kit zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	80
Darst. 41 relative mRNA-Expression von sca-1 zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	81
Darst. 42 relative mRNA-Expression des isl-1-Proteins zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	81
Darst. 43 relative mRNA-Expression von Vimentin zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	82
Darst. 44 relative mRNA-Expression von FSP zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	82
Darst. 45 relative mRNA-Expression von VEGF zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	82
Darst. 46 relative mRNA-Expression von c-Kit zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	83
Darst. 47 relative mRNA-Expression von sca-1 zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	84
Darst. 48 relative mRNA-Expression von VEGF zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten	84
Darst. 49 relative mRNA-Expression verschiedener Proteine	85
Darst. 50 Sarkomerstruktur einer ventrikulären Kardiomyozyte der Ratte	85
Darst. 51 CFC/CDC eine Woche nach Beginn der Differenzierung	86
Darst. 52 CFC/CDC eine Woche nach Beginn der Differenzierung, Kontrolle	86
Darst. 53 CFC/CDC zweite Woche nach Beginn der Differenzierung	86
Darst. 54 CFC/CDC zweite Woche nach Beginn der Differenzierung, Kontrolle	86
Darst. 55 CFC/CDC dritte Woche nach Beginn der Differenzierung	86
Darst. 56 CFC/CDC dritte Woche nach Beginn der Differenzierung, Kontrolle	86
Darst. 57 CFC/CDC Vimentin (rot), HOE (blau)	87
Darst. 58 CFC/CDC vWF schwach positiv	87

Darst. 59 Dieselbe Zellreihe wie Darst. 58	88
Darst. 60 Gleiche Zelllinie wie Darst. 58	88
Darst. 61 Endothelzellen Ratte	88
Darst. 62 humane Endothelzellen	88
Darst. 63 humane Fibroblasten	88
Darst. 64 ventrikuläre Kardiomyozyten Ratte	88
Darst. 65 Beeinflussung der konditionierten Überstände auf die Zellverkürzung	89
Darst. 66 Übersicht zu den in den Hypoxiemodellen verwendeten Zelllinien	90
Darst. 67 Hypoxiemodell A, relative mRNA-Expression	91
Darst. 68 relative mRNA-Expression von c-Kit	91
Darst. 69 relative mRNA-Expression von c-Kit in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer	91
Darst. 70 mRNA- Expression von sca-1 in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer	92
Darst. 71 mRNA-Expression von sca-1 in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer	92
Darst. 72 relative mRNA-Expression	92
Darst. 73 relative mRNA-Expression von Vimentin in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer	92
Darst. 74 relative mRNA-Expression von VEGF	93
Darst. 75 relative mRNA-Expression von VEGF	93
Darst. 76 relative mRNA-Expression humaner Fibroblasten	93
Darst. 78 Übersicht zu den Untersuchungen der Zellverkürzung	94
Darst. 77 relative mRNA-Expression humaner Endothelzellen in Bezug auf die Kontrolle	94
Darst. 79 Zellverkürzungsmessung des Hypoxiemodells A	95
Darst. 80 Zellverkürzungsmessung des Hypoxiemodells B	95
Darst. 81 Zellverkürzungsmessung der humanen Fibroblasten und der HUVECs	96
Darst. 82 Zellverkürzungsmessung des Hypoxiemodells C	96
Darst. 83 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.12	98
Darst. 84 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.12, Hypoxie vs. Normoxie	98
Darst. 85 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.12, Hypoxie vs. Normoxie	99
Darst. 86 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.22, Normoxie vs. Medium	99
Darst. 87 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.22, Hypoxie vs. Normoxie	100
Darst. 88 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.22, Hypoxie vs. Normoxie	101
Darst. 89 Übersicht Zytokine humane Fibroblasten, Normoxie vs. Medium	102
Darst. 90 Übersicht Zytokine Zelllinie humane Fibroblasten, Hypoxie vs. Normoxie	103
Darst. 91 Übersicht Zytokine Zelllinie humane Fibroblasten, Hypoxie vs. Normoxie	103

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Vol.-%	Volumenprozent
Gew.-%	Gewichtsprozent
a.b. (aqua bidest.)	zweifach destilliertes Wasser
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor (Wachstumsfaktor)
BMP	bone morphogenetic protein (Wachstumsfaktor)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCT	Creatin, Carnitin, Taurin
CDC	Cardiosphere derived cells (aus Kardiosphären wachsende Zellen)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CFC	cardiosphere forming cells (Kardiosphären bildende Zellen)
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	cardiac progenitor cells (kardiale Progenitorzellen)
CSF	colony stimulating factor (Kolonie stimulierender Faktor)
CT-1	Cardiotrophin-1
Ct-Wert	Cycle-Threshold (Schwellenwert Zyklus)
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Darst.	Darstellung
dl/l	relative Zellverkürzung/Zelllänge
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium nach Dulbecco)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDA-A2	Ectodysplasin A2 (Protein der TNF Superfamilie)
EDGF	endothelial derived growth factor (Wachstumsfaktor aus Endothelzellen)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EMFI	embryonic fibroblast medium (Zellkulturmedium für embryonale Fibroblasten)
ESC	European Society of Cardiology (Fachgesellschaft für Kardiologie)
EtOH	Ethanol
FADH ₂	reduzierte Form des Flavinadenindinukleotids
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
fw-Primer	forward primer (Oligonukleotid „forward“)
g	Gramm
GATA-4	Transkriptionsfaktor (zink finger), erkennt GATA-Motiv eines Promotors
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HIF	hypoxia inducible factor (Hypoxie induzierender Faktor)
HiFCS	Heat inactivated FCS (Hitze inaktiviertes FCS)
Hoe	Hoechst Farbstoff, H33342
hprt	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (Endothelzellen der Nabelschnurvene)
IE	internationale Einheiten
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Zellkulturmedium nach Iscove)
isl-1	Insulin gene enhancer Protein (Transkriptionsfaktor)
Jak	Janus Kinase (Tyrosinkinase)
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumcyanid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LIF	leukemia inhibitory factor (Zytokin)
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
MCP	monocyte chemoattractant protein (Zytokin)
mg	Milligramm
Mg ₂ SO ₄	Magnesiumsulfat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	myosin heavy chain (schwere Kette des Myosins)
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	myosin light chain (leichte Kette des Myosins)
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA Polymerase)
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-RNA)
MSC	mesenchymale Stammzelle
MVEC	microvascular endothelial cell (mikrovaskuläre Endothelzelle)
mw	molecular weight (Molekulargewicht)
n	Anzahl (Umfang der Stichprobe)
Na/Na ⁺	Natrium/Natriumion
N ₂	Stickstoff
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NADH, NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid und sein Ion
NaN ₃	Natriumazid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCS	neonatal calf serum (neonatales Kälberserum)
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NEA	Nicht-essenzielle Aminosäure
ng	Nanogramm
Nkx- 2.5	Homeobox Protein
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAF	platelet activating factor (Plättchenaktivierender Faktor)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	platelet derived growth factor (Wachstumsfaktor)
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PDA	persistierender Ductus arteriosus
PFA	Paraformaldehyd
pH (pondus Hydrogenii)	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PDL	Poly-D-Lysin
PLL	Poly-L-Lysin
PMCA	Plasmamembran-Kalzium ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
rcf	relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)
rev-Primer	reverse primer (Oligonukleotid „reverse“)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
s,sec	Sekunde
sca-1	Stammzellantigen-1
SD	standard deviation (Standardabweichung vom Mittelwert)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SERCA	Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium transporting ATPase (sarkoplasmatische/endoplasmatische Kalzium-ATPase)
SGP	Sammelgelpuffer
SOD	Superoxiddismutase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription (Proteine zur Signaltransduktion)
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Termus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline (Puffer)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TG	transgen
TGF- β	Transforming growth factor beta (Wachstumsfaktor)
TGP	Trenngelpuffer
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases (Gewebeinhibitor für Metalloproteasen)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Triton	Octoxinol 9
U	unit
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Wachstumsfaktor)
VSD	Ventrikel-Septum-Defekt
vWF	von Willebrand Faktor
x g	x-fache Erdbeschleunigung
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Regeneration und Bedeutung der Herzinsuffizienz

Die Regeneration ist ein wesentlicher Bestandteil des menschlichen Organismus und findet je nach Organsystem (Haut, Darm, Blutzellen etc.) in unterschiedlichem Ausmaß statt. Ergebnis einer erfolgreichen Regeneration ist ein funktionelles Gewebe, welches in der Lage ist, die Aufgaben des Ursprungsgewebes vollwertig zu übernehmen. Voraussetzung hierfür sind in der Regel intermitotische Zellen, d.h. Zellen, die aktiv in den Zellzyklus eintreten und selbigen durchlaufen können. Dem gegenüber stehen postmitotische Zellen, welche noch einmal in reversibel postmitotisch und fixiert postmitotisch zu unterteilen sind.¹ Das Herz gilt bislang als postmitotisches Organ, jedoch beschäftigen sich seit einigen Jahren diverse Studien mit einem möglichen regenerativen Potential einerseits aus so genannten (residenten) kardialen Progenitorzellen, andererseits aus Teilung adulter Kardiomyozyten.² In welchen Formen adulte Zellen an einer Regeneration teilnehmen könnten, beschreiben die Begriffe „Dedifferenzierung“, „Transdifferenzierung“ und „Reprogrammierung“.

Unter Dedifferenzierung versteht man die Rückentwicklung adulter terminal differenzierter Zellen in einen weniger differenzierten Zustand. Je nach Zelltyp erlaubt dieser Zustand, erneut zu proliferieren und somit Zellen der eigenen Linie zu regenerieren.³ Adulte Kardiomyozyten des Menschen und der Ratte zeigen *in vitro* bei Kultivierung über mehrere Tage eben diese Dedifferenzierung, sichtbar z.B. an deutlichen morphologischen Veränderungen.⁴ Allerdings wird diskutiert, inwiefern hier Dedifferenzierung und Proliferation überhaupt in Zusammenhang stehen, bzw. wie dem komplexen kontraktilen Apparat der Kardiomyozyten bei einer Zytokinese Rechnung getragen würde.⁵ Desweiteren wird bei der Dedifferenzierung von adulten Kardiomyozyten die Beteiligung von interstitiellen Zellen (Fibroblasten) und das

¹ Vgl. Köhler, H., Allgemeine Pathologie, 1990, S. 344-360.

² Vgl. Engel, F. B., Cardiomyocyte proliferation, 2005, S. 1360–1363; vgl. daz u auch Beltrami, A. P. et al., Evidence that, 2001, S. 1750–1757.

³ Vgl. Jopling, C et al., Dedifferentiation, transdifferentiation, 2011, S. 79–89.

⁴ Vgl. Piper, H. et al., Determinants of, 1988, S. 825–835; vgl. daz u auch Bird, S. D. et al., The human, 2003, S. 423–434.

⁵ Vgl. Jopling, C. et al., Dedifferentiation, transdifferentiation, 2011, S. 79–89.

Auftreten *in vivo* (abgesehen von den hohen fetalen Teilungsraten der Myozyten⁶) diskutiert, wobei insbesondere die niedrigen Zahlen zur Zellzyklusaktivität (0,0005-3%) und die Art der Bestimmung dieser (Mitosefiguren, Proteinumsatz, DNA-Synthese usw.) kritisch betrachtet werden.⁷ Unter Transdifferenzierung versteht man eine weitergehende Rückentwicklung der adulten Zellen bis zu dem Stadium, in dem sie in der Lage sind, zu einem anderen Zelltyp zu differenzieren. Ein Beispiel hierfür wäre die Umwandlung von Fibroblasten zu Kardiomyozyten (vgl. hierzu auch das Kapitel über Endothelzellen).⁸ Bei der Reprogrammierung hingegen müssen sich die Zellen am weitesten zurück entwickeln, denn über die Induktion von Genen sollen adulte Zellen wieder zu Stammzellen „programmiert“ werden.⁹

Betrachtet man die hohen Zahlen an kardiovaskulären Erkrankungen (hierzu zählen laut World Health Organisation neben koronaren Herzerkrankungen, cerebrovaskuläre, peripher arterielle, rheumatische und angeborene Herz- bzw. Gefäßerkrankungen auch die Venenthrombose und Lungenembolien¹⁰) weltweit, erklärt sich die hohe Bedeutung eines möglichen regenerativen Potentials des Herzens: Herzinsuffizienzen, die mit dem Untergang adulter Kardiomyozyten einhergehen, wären besser therapierbar. Aber nicht nur der Ersatz von Herzgewebe, sondern insbesondere auch die Untersuchung therapeutisch wirkender Substanzen aus Herzzellen in Form einer parakrinen Sezernierung ist ein möglicher Therapieansatz.

Ursachen einer Herzinsuffizienz sind u.a. eine chronische Druckbelastung (z.B. durch eine Stenose, angeborene Fehlbildung oder altersbedingte Zunahme des peripheren Widerstandes) oder eine Ischämie, wie sie bei einem Herzinfarkt zu Grunde liegt. In der Folge greifen Kompensationsmechanismen des Körpers wie der auch unter physiologischen Bedingungen aktive Frank-Starling-Mechanismus, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, die Stimulation des sympathischen Nervensystems und letztlich die Myokardhypertrophie, jedoch sind diese Maßnahmen endlich und

⁶ Vgl. Ahuja, P. et al., Cardiac myocyte, 2007, S. 521–544.

⁷ Vgl. Rubart, M. et al., Cardiac regeneration, 2006, S. 29–49; vgl. dazu auch Zaglia, T. et al., Cardiac interstitial, 2009, S. 653–662.

⁸ Vgl. Jopling, C. et al., Dedifferentiation, transdifferentiation, 2011, S. 79–89.

⁹ Vgl. Jopling, C. et al., Dedifferentiation, transdifferentiation, 2011, S. 79–89.

¹⁰ Vgl. World Health Organization, WHO Cardiovascular, 2011, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html

können langfristig, je nach Schweregrad der Erkrankung, die Entwicklung einer klinischen Symptomatik nicht verhindern.

	2010		2009		2008		2007		2006
	Rang	Gestorbene	Rang	Gestorbene	Rang	Gestorbene	Rang	Gestorbene	Rang
I25 Chronische ischämische Herzkrankheit	1	72.734	1	73.899	1	72.683	1	76.915	1
I21 Akuter Myokardinfarkt	2	55.541	2	56.226	2	56.775	2	57.788	2
I50 Herzinsuffizienz	3	48.306	3	48.954	3	48.918	3	49.970	3
C34 Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	4	42.972	4	42.221	4	42.319	4	41.495	4
J44 Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	5	25.675	6	25.216	6	22.328	6	21.716	6
I64 Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	6	23.675	5	25.425	5	26.503	5	26.911	5
I11 Hypertensive Herzkrankheit	7	20.604	8	19.771	8	19.235	8	18.553	9
J18 Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	8	18.391	7	21.029	7	21.051	7	21.079	7
C50 Bösartige Neubildung der Brustdrüse [Mamma]	9	17.573	10	17.197	10	17.345	10	17.029	10
C18 Bösartige Neubildung des Dickdarmes	10	17.161	9	17.501	9	17.920	9	18.072	8
Summe der angezeigten ICD-Positionen		342.632		347.439		345.077		349.528	
A00-T98 Krankheiten und Folgen äußerer Ursachen		858.768		854.544		844.439		827.155	

Darst. 1 Sterbefälle (absolut) für die 10 häufigsten Todesursachen; aus Gründen der Übersichtlichkeit modifiziert; es wird ein Auszug für die Jahre 2006-2010 abgebildet; Quelle: *Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, Todesursachenstatistik, 2011, www.gbe-bund.de, [Suchfunktion: Todesursachenstatistik, Link: Tabellen]*

Eine Einschätzung der Bedeutung der kardiovaskulären Erkrankungen und der Herzinsuffizienz für die Veterinärmedizin ist schwieriger, da es für viele Erkrankungen bei Hund und Katze Rassedispositionen gibt. In einer nordamerikanischen Studie aus dem Jahr 2011 werden rassespezifische und altersabhängige Todesursachen bei Hunden beschrieben. Hierbei spielen kardiovaskuläre Erkrankungen neben Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts und neurologischen Befunden gerade bei alternden Tieren eine Rolle.¹¹ Als häufige Erkrankung des Herzens beim Hund wird

¹¹ Vgl. *Fleming, J. et al., Mortality in, 2011, S. 187–198.*

in der Literatur die Endokardiose und die dilatative Kardiomyopathie angegeben. Für die Katze ist es rasseabhängig die hypertrophe Kardiomyopathie.¹²

1.2 Beschreibung der für diese Studie relevanten Zelltypen

1.2.1 Stammzellen und Progenitorzellen

Zellpopulationen werden im Allgemeinen nach ihrer Funktion bzw. ihrer Organzugehörigkeit definiert. Dies setzt voraus, dass eine eindeutige Charakterisierung der Zellen über spezifische Rezeptoren und Marker möglich ist. Die Tatsache, dass die Begriffe „Stammzelle“ und „Progenitorzelle“ in der Literatur nicht einheitlich verwendet werden, zeigt, wie schwierig eine genaue Klassifikation einer vorhandenen Zellpopulation ist. Bei den als „Stammzellen“ bezeichneten Zellen kommt erschwerend hinzu, dass noch immer nicht eindeutig geklärt ist, welche Faktoren eine Stammzelle undifferenziert lassen und ab wann bzw. wodurch eine Differenzierung erfolgt, d.h. ab wann eine Stammzelle zu einer Vorläuferzelle wird. Die folgenden Erläuterungen orientieren sich an der Definition der Deutschen Forschungsgemeinschaft: Stammzellen sind Zellen, die in alle Zelltypen des Organismus differenzieren können (= Pluripotenz).¹³ Sie besitzen die Eigenschaft der Selbsterneuerung und der Proliferation, d.h. der Erschaffung von Tochterzellen (=Vorläuferzellen/Progenitorzellen; i.d.R. bezeichnet als „Blasten“), welche bereits weiter ausdifferenziert und damit auf ein Organsystem beschränkt sind (= Multipotenz).¹⁴ Von diesen Stammzellen sind sehr frühe Zellstadien eines Embryos zu unterscheiden. Denn jede einzelne dieser embryonalen Zellen besitzt die Fähigkeit vollständige Organismen zu bilden: Sie sind totipotent. Dieses Potential haben Stammzellen und erst recht Progenitorzellen nicht mehr. Trotz dieser Unterscheidung werden die Begriffe „Stammzelle“ und „Progenitorzelle“ häufig synonym verwendet.

Neben der Klassifizierung anhand ihres Differenzierungspotentials werden Stammzellen nach dem Alter des Ursprungsorganismus zum Zeitpunkt der Gewinnung benannt: embryonale, fetale und adulte Stammzellen. Letztere beziehen

¹² Vgl. *Abbott, J. A.*, Canine and Feline Cardiology, 2008, S. 110; vgl. dazu auch *Oyama, M.A.*, Canine and Feline Cardiology, 2008, S. 139; vgl. dazu auch *Kienle, R.D.*, Canine and Feline Cardiology, 2008, S. 151-157.

¹³ Vgl., *Deutsche Forschungsgemeinschaft*, DFG Deutsche, 2011, www.dfg.de/dfg_magazin/forschungspolitik_standpunkte_perspektiven/stammzellforschung/was_sind_stammzellen/index.html

¹⁴ Vgl. *Morrison, S. J.* et al., *Regulatory Mechanisms*, 1997, S. 287–298.

sich auf Stammzellen aus Lebewesen nach ihrer Geburt. Die adulten Stammzellen sollen im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen ein geringeres Entwicklungspotential haben.¹⁵ Adulte Stammzellen liegen i.d.R. in sehr niedrigen Zellzahlen vor und besitzen eine geringe Proliferationsrate, erst die aus ihnen hervorgegangenen Progenitorzellen weisen hohe Zellteilungsraten auf.¹⁶ Bisher wurden aus verschiedenen Organen adulte Stammzellen bzw. Progenitorzellen isoliert: hierzu zählen die Nabelschnur, das Knochenmark und das Blut. Wie bereits angesprochen, gilt seit einigen Jahren auch das Herz als ein Organ mit regenerativem Potential. Worin dieses seinen Ursprung hat, ist Gegenstand aktueller Forschungsprojekte. Gegenübergestellt werden insbesondere residente endogene, d.h. im Herz in Nischen ansässige und aus dem Herzen stammende Stammzell- bzw. Progenitorzellpopulationen und solche, die in das Herz eingewandert sind („Homing“). Hierzu zählen mesenchymale, hämatopoetische und endotheliale Progenitorzellen.¹⁷ Zur Charakterisierung von Progenitorzellen dienen Marker wie sca-1 (stem cell antigen-1), c-Kit (Stammzellfaktorrezeptor; Rezeptortyrosinkinase), isl-1 (Islet-1, Transkriptionsfaktor), GATA4 (Transkriptionsfaktor, der insbesondere an die DNA-Sequenz GATA bindet) und Nkx 2-5 (Transkriptionsfaktor, das „x“ steht hierbei für „homeobox“). Insbesondere die letzten beiden genannten Faktoren sind entscheidend für die kardiale Entwicklung. Modifikationen in den dazugehörigen Genen können u.a. Missbildungen hervorrufen.¹⁸ Verschiedene Studien differenzieren die im Herzen untersuchten Zellen z.B. anhand der Expression der Marker c-Kit und sca-1 oder der Bildung so genannter Kardiosphären.¹⁹ Auf die Kardiosphären wird im Verlauf der Arbeit noch näher eingegangen. Zuletzt sei noch erwähnt, dass adulte Stammzellen Zytokine wie VEGF, MMP, TIMP oder Interleukine sezernieren und so ihren Funktionen entsprechend mit anderen Zellen kommunizieren.²⁰

¹⁵ Vgl., *Deutsche Forschungsgemeinschaft*, DFG Deutsche, 2011, www.dfg.de/dfg_magazin/forschungspolitik_standpunkte_perspektiven/stammzellforschung/was_sind_stammzellen/index.html

¹⁶ Vgl. *Barile, L. et al.*, Endogenous cardiac, 2007, S. 31–48.

¹⁷ Vgl. *Noort, W. A. et al.*, Stem cells, 2009, S. 699–709; vgl. dazu auch *Smart, N. et al.*, The Stem, 2008, S. 1155–1168.

¹⁸ Vgl. *Schlesinger, J. et al.*, The cardiac, 2011, S. e1001313.

¹⁹ Vgl. *van Vliet, P. et al.*, Progenitor cells, 2008, S. 163–169; vgl. dazu auch *Burchfield, J. S. et al.*, Role of, 2008, S. 4.

²⁰ Vgl. *Gnecchi, M. et al.*, Paracrine mechanisms, 2008, S. 1204–1219; vgl. dazu auch *Burchfield, J. S. et al.* Role of, 2008, S. 4.

In dieser Arbeit meint der Begriff „kardiale Progenitorzellen“ die für die Differenzierung in Herzgewebe bestimmten und damit in ihrem Differenzierungspotential auf die „Herzlaufbahn“ programmierten Vorläuferzellen, welche die Möglichkeit besitzen, *in vitro* eine Ausprägung in Richtung mesenchymales Gewebe, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und/oder Kardiomyozyten anzunehmen. Sie werden aus Gewebe eines adulten und nicht eines embryonalen/fetalen Herzens isoliert, allerdings ist hiermit keine Kausalität zur Herkunft der Zellen (ob im Organ ansässig oder eingewandert) zu ziehen. Außerdem soll diese Zellpopulation als abgegrenzt von aus denselben Proben isolierten fibroblastenartigen Zellen (die in ihrer ureigenen Wortbedeutung ebenfalls Progenitorzellen sind) diskutiert werden. Das bedeutet, dass es sich bei den „kardialen Progenitorzellen“ um eine separat identifizierte Zellpopulation im Herzen handeln soll.

1.2.2 Fibroblasten

Im Allgemeinen versteht man unter Fibroblasten Zellen des Bindegewebes. Sie besitzen einen spindelförmigen Zellkörper mit unregelmäßigen Zellausläufern, keine Basalmembran, einen ovalen Zellkern und reichlich raues endoplasmatisches Retikulum.²¹ Sie kommen in den unterschiedlichsten Geweben des Körpers vor und erfüllen je nach den lokalen Ansprüchen verschiedene Aufgaben.²² Demnach betrachtet man Fibroblasten nicht mehr als statische Zelle, sondern als eine heterogene Zellpopulation, was ihre Charakterisierung nicht einfach macht.²³ Neben Markern wie Vimentin, werden der discoidin domain receptor 2 (DDR2) und das Fibroblastenspezifische Protein (FSP1) zur Identifizierung angewendet.²⁴ Fibroblasten fungieren nicht nur als Strukturgeber durch die Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix, sondern dienen über die aktive Sezernierung von Interleukinen (IL-6, TNF- α u.a.) und Wachstumsfaktoren (TGF- β , VEGF)²⁵ auch als „Sentinel-“ oder „Feederzellen“, letzteres indem sie den eigentlichen Zielzellen ein

²¹ Vgl. Baudino, T. A. et al., Cardiac fibroblasts, 2006, S. H1015-26.

²² Vgl. Souders, C. A. et al., Cardiac fibroblast, 2009, S. 1164–1176; vgl. dazu auch Krenning, G. et al., The origin, 2010, S. 631–637.

²³ Vgl. Fries, K. M. et al., Evidence of, 1994, S. 283–292.

²⁴ Vgl. Camelliti, P. et al., Structural and, 2005, S. 40–51; vgl. dazu auch Strutz, F et al., Identification and, 1995, S. 393–405.

²⁵ Vgl. Ottaviano, F. G. et al., Communication signals, 2011, S. 513–521; vgl. dazu auch Koumas, L. et al., Fibroblast heterogeneity, 2001, S. 925–935.

optimales Milieu zum Zellwachstum anbieten.²⁶ Diese Interaktionen zwischen Fibroblasten und anderen Zellen finden sich im Herzen oder auch in der Lunge und zwar nicht nur in Form des physiologischen Wechselspiels zwischen den Zellpopulationen, sondern auch in der Beeinflussung der Expression verschiedener Marker in Abhängigkeit von der pathologischen Situation des Gewebes (wie z.B. eine Fibrose).²⁷ Betrachtet man die Verteilung von Kardiomyozyten zu nicht-kardiomyozytären Zellen im Herzen so fällt auf, dass es dabei spezieabhängige Unterschiede gibt. Gemeinsam ist allen aber der hohe Anteil an Fibroblasten.²⁸ Diese kardialen Fibroblasten sind beteiligt an der Produktion (z.B. Collagensynthese) und Degradation der extrazellulären Matrix (z.B. MMP und TIMP), an der Sekretion von Wachstumsfaktoren, der kardialen Angiogenese und der Elektrophysiologie.²⁹ Schließlich spielen sie auch in der Pathophysiologie der kardialen Fibrose und der damit einhergehenden ventrikulären Funktionsstörung eine entscheidende Rolle (Patienten mit Herzversagen haben hohe Spiegel an von verschiedenen Zellen produzierten Zytokinen wie den Interleukinen³⁰). Allerdings wird darüber diskutiert, woher die Fibroblasten bezogen auf dieses Geschehen ihren Ursprung haben: Eine mögliche Variante ist die so genannte endothelial-mesenchymale Transition, bei der sich Endothelzellen zu Fibroblasten umwandeln. Dieser Prozess findet ansonsten neben der ähnlichen epithelial-mesenchymalen Transition normalerweise während der Embryogenese statt.³¹

1.2.3 Endothelzellen

Unter „Endothel“ versteht man ein „einschichtiges Plattenepithel als Innenauskleidung der Gefäße“.³² Allerdings muss beachtet werden, dass morphologische Unterschiede je nach Gefäßtypus auch innerhalb eines Organs bestehen: In den Kapillaren unterscheidet man zwischen einem geschlossenen Endothel, welches keine Poren aufweist, einem fenestrierten und einem offenen Endothel. Diese Formen sind

²⁶ Vgl. *Smith, R. S.* et al., *Fibroblasts as*, 1997, S. 317–322; vgl. dazu auch *Minuth, W. W.* et al., *Von der Zellkultur*, 2002.

²⁷ Vgl. *Ramírez, G.* et al., *Absence of*, 2011, S. 1206–1218; vgl. dazu auch *Shoji, S.* et al., *Lung fibroblasts*, 1989, S. L71–9.

²⁸ Vgl. *Vliegen, H. W.* et al., *Myocardial changes*, 1991, S. 488–494; vgl. dazu auch *Ottaviano, F. G.* et al., *Communication signals*, 2011, S. 513–521.

²⁹ Vgl. *Tsuruda, T.* et al., *Matrix metalloproteinases*, 2004, S. 53–61; vgl. dazu auch *Krenning, G.* et al., *The origin*, 2010, S. 631–637.

³⁰ Vgl. *Ottaviano, F. G.* et al., *Communication signals*, 2011, S. 513–521.

³¹ Vgl. *Zeisberg, E. M.* et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition*, 2007, S. 952–961.

³² *Wörterbuch-Redaktion Walter de Gruyter GmbH & Co. KG (Hrsg.)*, *Psyhyrembel*, 2002, S. 446

angepasst an die Funktion, die sie erfüllen müssen. Grob gesagt ist die Endothelzellstruktur umso lockerer, je höher der benötigte Stoffaustausch ist.³³ Endothelzellen fungieren jedoch nicht nur als Auskleidung der Gefäße, sondern sind als zelluläre Komponente auch Teil des Gerinnungssystems und der Thrombolyse, regulieren über den Gefäßtonus den Blutfluss und wirken immun- und entzündungsmodulierend (u.a. sezernieren sie Interleukine wie IL-1,-6 und -8 und Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF und EDGF).³⁴

In vitro zeigen Endothelzellen zunächst ein inselförmiges Wachstum, um mit zunehmender Proliferation über drei bis fünf Tage einen geschlossenen Monolayer zu bilden. Morphologisch besitzen sie einen deutlich sichtbaren Zellkern mit mehreren prominenten Nucleoli³⁵ und reagieren relativ empfindlich auf ihr Umgebungsmilieu, indem sie ihre Morphologie und die Ausprägung ihrer Oberflächenrezeptoren bis hin zu einer Transdifferenzierung z.B. zu glatten Muskelzellen anpassen.³⁶ In der Zellkultur gibt es u.a. einen aktiven aussprossenden (engl. „sprouting“) und einen Kopfsteinpflaster-Typus (engl. „cobblestone“).³⁷ Dieser Typ ist nach dem charakteristischen Muster benannt, den Zellkulturen von Endothelzellen bei der Betrachtung durch ein Phasenkontrastmikroskop zeigen. Aktiviert können Endothelzellen verschiedene Faktoren sezernieren, darunter PAF, IL-8 oder auch vWF. Letzteres dient neben dem Oberflächenrezeptor CD31 der Charakterisierung dieser Zellen und befindet sich normalerweise im Cytoplasma bzw. in den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen.³⁸ Endothelzellen stammen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit dem hämatopoetischen System ab: dem Hämangioblasten. Über diese Zelle sind sie an der embryonalen Vaskulogenese und der späteren Angiogenese beteiligt.³⁹ Endothelzellen lassen sich aus verschiedenen Gefäßen gewinnen und werden entsprechend unterschieden in „human umbilical vein endothelial cells“ (=HUVEC), „microvascular endothelial cells“ (=MVEC) und Endothelzellen aus der Aorta (=makrovaskuläre Endothelzellen). Die Nabelschnurvene hat den Vorteil, dass sie unverzweigt und relativ groß ist.

³³ Vgl. Liebich, H.-G., Kreislaufsystem, 1999, S. 118-131.

³⁴ Vgl. Sumpio, B. E. et al., Cells in focus, 2002, S. 1508-1512.

³⁵ Vgl. Gimbrone, M. A., Human vascular, 1974, S. 673-684.

³⁶ Vgl. Sumpio, B. E. et al., Cells in focus, 2002, S. 1508-1512 ; vgl. dazu auch Augustin, H. G. et al., Differentiation of, 1994, S. 901-906; vgl. dazu auch Cines, D. B. et al., Endothelial cells, 1998, S. 3527-3561.

³⁷ Vgl. Canfield, A. E. et al., Aortic endothelial, 1992, S. 807-814; vgl. dazu auch Schwartz, S. M., Selection and, 1978, S. 966-980.

³⁸ Vgl. Sumpio, B. E. et al., Cells in focus, 2002, S. 1508-1512.

³⁹ Vgl. Sumpio, B. E. et al., Cells in focus, 2002, S. 1508-1512.

Außerdem besitzt sie eine große Oberfläche, so dass sich hier Endothelzellen technisch sehr gut isolieren lassen.⁴⁰

1.2.4 Kardiomyozyten

Dieses Kapitel orientiert sich an den in der Fußnote aufgelisteten Lehrbüchern:⁴¹ Die Herzmuskulatur besitzt, bedingt durch ihre Funktion, eine komplexe Morphologie und unterscheidet sich in wichtigen Punkten von der Skelettmuskulatur. So besteht das Herzmuskelgewebe aus Fasern, die durch einzelne ca. 100 – 150µm lange Herzmuskelzellen gebildet und durch Glanzstreifen begrenzt werden. Glanzstreifen sind spezielle Zellmembranabschnitte, über die die Herzzellen fest miteinander verbunden sind und über die die Synchronisation der Kontraktion stattfindet. Jede Herzmuskelzelle besitzt i.d.R. einen (bis zwei) zentralständige(n) Kern(e) und zeigt die charakteristische Querstreifung des Zytoplasmas, welche u.a. durch die stringente Anordnung der Moleküle Aktin und Myosin zustande kommt. Die Aktinfilamente werden über α -Actinin quervernetzt; das Myosinmolekül besteht aus beweglichen leichten Ketten (L-Meromyosin, MLC) und aus kugelförmigen schweren Ketten (H-Myosin, zwei Isoformen α - und β -MHC), die die enzymatische ATP-Spaltung vermitteln. Es finden sich keine Satellitenzellen in der Herzmuskulatur.

Bei der Kontraktionsauslösung muss zwischen Skelettmuskel und Herzmuskel unterschieden werden. Aus diesem Grunde werden beide Systeme nachfolgend vergleichend beschrieben: Im Skelettmuskel werden die Muskelfasern von der Plasmamembran umgeben, von der aus sich das Transversalsystem als „Ausstülpungen“ der Plasmamembran rechtwinklig zwischen die Muskelfasern legt. Das Transversalsystem kommuniziert über einen spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanal und den Ryanodinrezeptor (weiterer Kalziumkanal im sarkoplasmatischen Retikulum) mit den parallel zum Transversalsystem verlaufenden terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums. Die terminalen Zisternen wiederum sind untereinander verbunden und bilden so das Longitudinalsystem. Das sarkoplasmatische Retikulum dient als Kalziumspeicher. Somit sind die anatomischen Voraussetzungen für die Übertragung des elektrischen

⁴⁰ Vgl. *Gimbrone, M. A.*, Human vascular, 1974, S. 673–684.

⁴¹ Vgl. *Liebich, H.-G.*, Funktionelle Histologie, 1999; vgl. dazu auch *Drenckhahn, D.*, Zellenlehre, 2003, S. 9-91; vgl. dazu auch *Drenckhahn, D.*, Gewebelehre, 2003, S. 93-207; vgl. dazu auch *Peiper, U.*, Muskulatur, 2003, S. 81-108; vgl. dazu auch *Schrader, J.*, Das Herz, 2003, S. 109-144; vgl. dazu auch *Golenhofen, K.*, Basislehrbuch Physiologie, 2006.

Signals aus einer Nervenendigung (motorische Endplatte) in die Muskelfaser gegeben: Von der Nervenendigung aus wird Acetylcholin freigesetzt, welches an den nikotinergen Acetylcholinrezeptor der Muskelmembran bindet und ihn dadurch passierbar für Natriumionen macht. Der Einstrom der Natriumionen führt zu einer Aktivierung weiterer spannungsabhängiger Natriumkanäle: Das muskuläre Aktionspotential wird ausgelöst und wandert über das Transversalsystem bis zum L-Typ Kalziumkanal. Dieser wird spannungsabhängig in seiner Konformation geändert und führt zu einer Öffnung des Ryanodinrezeptors der terminalen Zisterne des sarkoplasmatischen Retikulums. Das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzte Kalzium löst in der Folge die Muskelkontraktion aus: Es bindet an Troponin C, einer Untereinheit des Troponinmoleküls. Das Troponinmolekül besteht aus Troponin I (Bindung an Aktin), Troponin T (Bindung an Tropomyosin) und Troponin C (Bindung des Kalziums). Dadurch wird der Troponin-Tropomyosinkomplex verschoben, die Bindungsstelle für das Myosinmolekül am Aktinfilament wird frei und der Querbrückenzyklus kann ablaufen.

Abweichend hierzu erfolgt die Aktivierung des Ryanodinrezeptors in der Herzmuskelzelle nicht über eine Konformationsänderung im direkten Kontakt zum L-Typ Kalziumkanal, sondern über einen als Kalzium induzierte Kalziumfreisetzung (CICR) bekannten Mechanismus. In den Herzmuskelzellen ist das sarkoplasmatische Retikulum weniger ausgeprägt und sie verfügen nicht über motorische Endplatten, vielmehr ist das Herzgewebe, bedingt durch die Verbindung der Herzmuskelzellen durch Verbindungsstrukturen (Connexin 43) in den Glanzstreifen, eine einzige Einheit. Nerven spielen hierbei keine Rolle, gleichwohl sie über Transmitter regulierend einwirken können. Die spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom L-Typ liegen in der gesamten Plasmamembran verteilt und werden während der Plateauphase des Aktionspotentials geöffnet. Gleichzeitig werden die Ryanodinrezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums über das einströmende Kalzium getriggert (also nicht durch den direkten Kontakt zwischen L-Typ Kalziumkanal und Ryanodinrezeptor, sondern durch das einströmende Kalzium aus den L-Typ Kalziumkanälen der Plasmamembran) und sorgen zusätzlich für die Erhöhung der Kalziumkonzentration aus dem Speicher. Im Herzmuskel ist diese kombinierte Kalziumkonzentrationserhöhung für die Kraftentwicklung entscheidend und vor allem abhängig vom extrazellulären KalziumEinstrom. Im Skelettmuskel ist es

hingegen hauptsächlich das Kalzium im sarkoplasmatischen Retikulum, d.h. er ist weniger abhängig vom extrazellulären Kalziumeinstrom. Die Kontraktion endet mit dem Sinken der cytosolischen Kalziumkonzentration. Dies wird durch verschiedene Mechanismen erreicht: Zum einen über die SERCA (eine Kalzium-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum; sie wird durch Phospholamban reguliert und liefert im gesunden Herzen den größten Beitrag zur Kalziumrückresorption), zum anderen über sekundär-aktiven Transport über Natrium-Kalium-ATPase getriebene Natrium-Kalzium-Austauscher (=NCX) und über Kalzium-ATPasen (=PMCA; sorgen für den geringsten Kalziumrücktransport) im Transversalsystem.⁴² Zusätzlich können die Mitochondrien der Herzmuskelzelle bei einem zu hohen Kalziumangebot selbiges aufnehmen. Die geschilderten strukturellen Systeme der Kardiomyozyten sind sowohl auf molekularer als auch auf makroskopischer Ebene beeinflussbar: so gibt es Untersuchungen zu einem Shift der Expression von α - zu β -MHC im Verlauf eines adaptiven Umbauprozesses, dem so genannten Remodeling, als Reaktion auf Gewebeverlust durch Infarkt oder auf eine anhaltende Druckbelastung.⁴³ Außerdem wirken proinflammatorische, antiinflammatorische und kardioprotektive Zytokine auf die Herzmuskelzelle.⁴⁴ Dass sich Erkrankungen des Myokards auf molekularer Ebene in einem gestörten Kalziumhandling äußern können, ist schon seit vielen Jahren bekannt.⁴⁵ Hierbei ist die Wiederaufnahme in und die Kalzium-Speicherkapazität des sarkoplasmatischen Retikulums gestört; ein Faktor hierfür ist eine verminderte Expression der SERCA. Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung dieser Insuffizienz werden bereits diskutiert.⁴⁶

1.2.5 Zellen dieser Studie

Die Gewinnung der Zellen für diese Studie erfolgte nach dem Protokoll von Messina et al. aus humanem Herzgewebe.⁴⁷ Zum Vergleich der Zellpopulationen wurden außerdem humane arterielle Lungenfibroblasten und humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) kultiviert. Hingegen wurden für die Messung des Kontraktionsverhaltens Kardiomyozyten von Wistar-Ratten verwendet.

⁴² Vgl. Bers, D. M., Cardiac excitation-contraction, 2002, S. 198–205; vgl. dazu auch Gwathmey, J. K. et al., Cardiac gene, 2011, S. 803–812.

⁴³ Vgl. Krenz, M. et al., Impact of, 2004, S. 2390–2397.

⁴⁴ Vgl. Pulkki, K. J., Cytokines and, 1997, S. 339–343.

⁴⁵ Vgl. Morgan, J. P. et al., Abnormal intracellular, 1990, S. III21–32; vgl. dazu auch Lehnart, S. E. et al., Abnormalities of, 2009, S. 213–224.

⁴⁶ Vgl. Gwathmey, J. K. et al., Cardiac gene, 2011, S. 803–812; vgl. dazu auch Hasenfuss, G. et al., Calcium cycling, 2002, S. 951–969.

⁴⁷ Vgl. Messina, E. et al., Isolation and, 2004, S. 911–921.

Die Zellen, die aus der Kultivierung des humanen Herzgewebes stammen, werden nachfolgend entsprechend ihrer Morphologie im Phasenkontrastmikroskop und in Anlehnung an die Veröffentlichungen von Messina et al. bzw. Barile et al. als „Cardiosphere forming cells“ (CFC; Kardiosphären bildende Zellen)⁴⁸ bezeichnet. Hiervon zu unterscheiden sind die Zellen, die nach Kultivierung einzelner Kardiosphären aus diesen wachsen und als „Cardiosphere derived cells“ (CDC)⁴⁹ bezeichnet werden.

1.3 Zytokine und ihre Wirkungen

Folgende Erläuterungen erfolgen in Anlehnung an die in den Fußnoten aufgeführten Quellen.⁵⁰ Zytokine sind bis zu 25kDa (andere Quellen besagen bis zu 100kDa)⁵¹ kleine Peptide mit hauptsächlich para- und autokrinem Wirkmuster. Das bedeutet, dass sie von einer Zelle gebildet werden und entweder auf die Nachbarzellen bzw. die nähere Umgebung (parakrin) oder auf die Zelle selbst (autokrin) einwirken. Ihre Einteilung erfolgt nach verschiedenen Kriterien: Beruft man sich auf die biologische Funktion (und nicht auf strukturelle Elemente oder ihre jeweiligen Rezeptoren), unterscheidet man Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, FGF, CSF), Interleukine (proinflammatorische: IL-1, TNF; antiinflammatorische: IL-4, IL-10, IL-13; pro- und antiinflammatorische: IL-6, IL-11, LIF, CT-1 u.a.), Interferone (z.B. Interferon- γ) und Chemokine (z.B. MCP, IL-8). Ihre Wirkung entfalten Zytokine schon in sehr geringen Mengen (piko- bis nanomolarer Bereich), wobei verschiedene Zytokine die gleiche Wirkung auf eine Zielzelle haben können (Redundanz) bzw. die gleichen Zytokine auf verschiedenen Zelltypen einwirken (Pleiotropismus). Grundsätzlich können Zytokine Apoptose, Proliferation und/oder Differenzierungsvorgänge beeinflussen oder induzieren. Außerdem vermitteln sie Wechselwirkungen mit anderen Zytokinen.

Interleukine wurden ursprünglich aus Leukozyten isoliert und auf ihre Interaktionen zwischen diesen Zellen hin untersucht. Mittlerweile ist ihre Herkunft für eine Vielzahl an Zellen, wie in den obigen Kapiteln beschrieben, nachgewiesen.⁵² Anhand des Interleukin-6 soll näher auf die Funktionsweise dieser Peptide eingegangen werden.

⁴⁸ Vgl. Messina, E. et al., Isolation and, 2004, S. 911–921.

⁴⁹ Vgl. Barile, L. et al., Endogenous cardiac, 2007, S. 31–48.

⁵⁰ Vgl. Löffler, G., chemische Kommunikation, 2005, S.789-811; vgl. dazu auch Heinrich P.C. et al., Zytokine, 2005, S. 813-835; vgl. dazu auch Janeway, C. A. et al., Immunologie, 2002.

⁵¹ Vgl. Loppnow, H., Zytokine: Klassifikation, 2001, S. 13–27.

⁵² Vgl. Wollert, K. C. et al., The role, 2001, S. 95–103.

Grundlage ist die Veröffentlichung von Wollert et al.⁵³ Interleukin-6 gehört zu einer ganzen Familie (u.a. IL-11, LIF, Oncostatin M und CT-1) von pro- und inflammatorischen Zytokinen, die sowohl pleiotrop als auch redundant wirken. Ihnen gemeinsam ist die Bindung an das transmembranäre Glycoprotein gp130, welches als Homodimer oder als Heterodimer mit dem LIF-Rezeptor vorliegt. Unterschiede in den Rezeptoren sind lediglich durch die so genannte α -subunit gegeben, die relativ spezifisch das jeweilige Zytokin bindet. Das gp130 liegt in sehr vielen Geweben vor, die jeweiligen α -subunits jedoch nicht. Dies erklärt die Pleiotropie innerhalb dieser Familie. Für die IL-6 Familie (genauer IL-6 und CT-1) wurden verschiedene protektive Eigenschaften untersucht, u.a. der Schutz vor der durch chronische Volumenbelastung induzierten Apoptose der Kardiomyozyten.⁵⁴ Ihre Wirkung entfalten Interleukine z.B. über den so genannten Jak/STAT-Signaltransduktionsweg. Hierbei ist eine Tyrosinkinase (Jak) an das gp130 der jeweiligen Rezeptoren der Interleukine gekoppelt und vermittelt bei Bindung des Liganden die Phosphorylierung der STAT-Proteine. Diese dimerisieren und verlagern sich aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirkend, Promotoren verschiedener Gene aktivieren.⁵⁵

1.4 Hypoxie

Um überleben zu können, benötigen Zellen Energie, welche für den Körper in verwertbaren Formen vorliegen muss. Bezugsquelle ist hierfür die in der Nahrung enthaltene Glukose, die im Cytosol bzw. den Mitochondrien über Glykolyse, Tricarbonsäurezyklus und Atmungskette in energiereiche Phosphate (ATP, Kreatinphosphat) umgesetzt wird. Essentiell für eine effiziente aerobe Verstoffwechselung ist Sauerstoff (oxidative Phosphorylierung, OXPHOS), welcher über den Gasaustausch in der Lunge hauptsächlich chemisch an das Hämoglobin der Erythrozyten gebunden (der Herzmuskel besitzt außerdem Myoglobin, welches ebenfalls mit hoher Affinität Sauerstoff bindet) in das Blut übergeht und über die Kapillaren per Diffusion in die Zellen gelangt. Zu unterscheiden sind die Begriffe Sauerstoffsättigung, Sauerstoffkapazität, Sauerstoffkonzentration und Sauerstoffpartialdruck. Die Sauerstoffsättigung gibt das Verhältnis der mit Sauerstoff

⁵³ Vgl. Wollert, K. C. et al., The role, 2001, S. 95–103.

⁵⁴ Vgl. Stephanou, A. et al., Cardiotrophin-1 induces, 1998, S. 849–855.

⁵⁵ Vgl. Heim, M. H., The Jak-STAT, 1996, S. 1–12; vgl. dazu auch Schindler, C. et al., Transcriptional responses, 1995, S. 621–651.

beladenen Hämkonzentration zur gesamten Hämkonzentration (desoxygeniert und oxygeniert) an (letzteres entspricht im Grunde der Sauerstoffkapazität). Die Sauerstoffkonzentration hingegen bezieht sich auf die Gesamtmenge Sauerstoff pro Volumen Blut und der Sauerstoffpartialdruck gibt den Anteil des Sauerstoffs am Gesamtdruck eines Gasgemisches an. Grundsätzlich ist die Sauerstoffsättigung umso höher, je höher auch der Sauerstoffpartialdruck ist, allerdings folgt die Abhängigkeit einem sigmoiden Verlauf.⁵⁶

Übersteigt die Nachfrage an Sauerstoff das Angebot, reagiert der Körper abhängig von der Dauer des Defizits zunächst mit Erhöhung der Atmungsfrequenz und der Steigerung des Herz-Minutenvolumens, um bei chronischem Mangel zu vermehrter Bildung von Erythrozyten und Hämoglobin überzugehen.⁵⁷ Sauerstoffmangel im Gewebe kann wie folgt unterschieden werden:⁵⁸ Die hypoxämische Gewebehypoxie beruht auf einem erniedrigten Gasaustausch in der Lunge und der damit einhergehenden geringen Sauerstoffsättigung des Blutes, die anämische Gewebehypoxie ist bedingt durch die Erniedrigung der Sauerstoffkapazität der Erythrozyten (z.B. Anämie oder Oxidierung des Hämoglobins) und die ischämische Gewebehypoxie beruht auf einer Durchblutungsstörung der versorgenden Gefäße wie sie z.B. bei einem Infarkt vorkommt.

Auf molekularer Ebene bedeutet ein Sauerstoffmangel den Übergang von der aeroben zur anaeroben Glykolyse und die Induktion verschiedener Gene bzw. Transkriptionsfaktoren. Was das im Einzelnen bedeutet, wird nachfolgend erklärt.⁵⁹ Ziel der Glykolyse ist die Gewinnung von Energie über ATP. Hierbei ist die aerobe Glykolyse mit anschließendem Tricarbonsäurezyklus und Endoxidation deutlich effizienter als die anaerobe Glykolyse: Sie erzeugt mehr ATP über die Reduktion von NAD^+ bzw. der Erzeugung von FADH_2 für die Endoxidation und verbraucht deutlich weniger Glukose (Pasteur-Effekt). Der erste Schritt der Glykolyse, der Embden-Meyerhof-Weg (Glukose wird zu Pyruvat) ist zwar aerob und anaerob identisch, anaerob wird das Pyruvat aber zu Laktat verstoffwechselt, hierbei wird NADH verbraucht. Die Energieausbeute beschränkt sich anaerob somit auf den Embden-

⁵⁶ Vgl. *Scheid, P.*, Atmung, 2003, S.217-286.

⁵⁷ Vgl. *Guillemin et al.*, The hypoxic, 1997, S. 9–12.

⁵⁸ Vgl. *Scheid, P.*, Atmung, 2003, S.217-286.

⁵⁹ Vgl. *Guillemin et al.*, The hypoxic, 1997, S. 9–12; vgl. dazu auch *Liemburg-Apers, D. C. et al.*, Quantitative Glucose, 2011.

Meyerhof-Weg. Wie aus diesen Beschreibungen ersichtlich, ist die Zelle bei Sauerstoffmangel in der Lage, diesen für einige Zeit zu kompensieren. Allerdings zeigt die geringere Energieausbeute der anaeroben Glykolyse diesem Mechanismus seine Grenzen auf und es kann zum Zelltod kommen. Für die einzelnen Gewebe ist die benötigte Sauerstoffkonzentration sehr unterschiedlich.⁶⁰ Das Herzgewebe ist insofern besonders, als dass Bedarf und Verbrauch des Sauerstoffs kontinuierlich ausgeglichen sein müssen, eine „Sauerstoffschuld“ kann nicht eingegangen werden.⁶¹ Referenzwerte, den Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut betreffend (je nach Quelle differieren die Werte), liegen für eine Normoxie bei ~90-100mmHg und für eine Hypoxie bei <50-60mmHg.⁶² Desweiteren liegen die Werte für eine Normoxie in den mikrovaskulären Gefäßen des Epikards (in diesem Fall bezogen auf die Tierart Schwein) bei 12-17mmHg.⁶³ *In vitro* variieren die Definitionen einer Hypoxie bzw. Normoxie; so legt eine Studie für Nervenzellen *in vitro* Sauerstofflevel für die Normoxie mit ~8%, für eine milde (oder auch physiologische) Hypoxie mit 2,5-5% und für eine hochgradige Hypoxie mit <1% fest.

Neben den beschriebenen Stoffwechselvorgängen erzeugt eine Hypoxie auf molekularer Ebene weitere Veränderungen, die sich nach Lopez-Barneo⁶⁴ grob in akute (Sekunden bis Minuten) und chronische (Stunden bis Tage) Anpassungsmechanismen unterscheiden lassen: die schnell einsetzenden molekularen Antworten einer Hypoxie werden z.B. über Sauerstoff sensitive Ionenkanäle (K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} -Kanäle) vermittelt, die langfristigen Antworten umfassen u.a. die Aktivierung verschiedener Gene über Transkriptionsfaktoren für Angiogenese, Erythropoiese, Hypertrophie und Sezernierung von Vasodilatoren mit Ausschüttung entsprechender Zytokine (VEGF, PDGF).⁶⁵ So wird z.B. der Transkriptionsfaktor HIF-1 α induziert, der als ursächlich für die Initiierung eben dieser Stoffwechselvorgänge gilt. Der Transkriptionsfaktor HIF besteht aus verschiedenen Untereinheiten, HIF-1 β und HIF- α (die α -Untereinheit gibt es in den drei Isoformen HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α). Beide Untereinheiten werden ständig exprimiert, allerdings unterliegt die Stabilität der HIF- α Einheit dem Sauerstoffpartialdruck. Ist er

⁶⁰ Vgl. Filippis, L. (de) et al., Hypoxia in, 2011, S. 2831-2844.

⁶¹ Vgl. Winegrad, S. et al., Self-protection by, 1999, S. 690-698.

⁶² Vgl. Lopez-Barneo, J. et al., Cellular mechanism, 2001, S. 259-287.

⁶³ Vgl. Rumsey, W. L. et al., Oxygen pressure, 1994, S. H1676-80; vgl. dazu auch Jiang, B. H. et al., Hypoxia-inducible factor, 1996, S. C1172-80.

⁶⁴ Vgl. Lopez-Barneo, J. et al., Cellular mechanism, 2001, S. 259-287.

⁶⁵ Vgl. Lopez-Barneo, J. et al., Cellular mechanism, 2001, S. 259-287.

hoch, wird die α -Untereinheit abgebaut, ist er niedrig bleibt sie erhalten.⁶⁶ Der sensible Bereich des Sauerstoffs für die Induktion des HIF liegt zwischen 0,5 und 5% (= physiologische Hypoxie). Darunter (also in nahezu anoxischen Bereichen) lässt sich HIF nicht mehr in gleicher Art und Weise induzieren.⁶⁷ Die Wirkung dieses Heterodimers erfolgt über die Induktion verschiedener Gene, die ein Hypoxie sensitives Element beinhalten, mit welchem HIF interagiert.⁶⁸

Detektiert wird eine Hypoxie klassischerweise in Chemorezeptororganen wie dem Glomus caroticum, allerdings werden Sauerstoff sensitive Mechanismen in nahezu allen Zellen inklusive der Herzzellen exprimiert.⁶⁹ Wie die genaue Signalkaskade ausgehend von einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck über die Sauerstoff messenden Organe zu den Ionenkanälen bzw. zu der Expression von Transkriptionsfaktoren abläuft, ist nicht genau bekannt. Allerdings haben viele Studien die Wirkung so genannter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) untersucht, die unter Hypoxie vermehrt produziert werden und über Hemmung von Prolylhydroxylasen unter physiologischen Hypoxien den Abbau des Transkriptionsfaktors HIF verhindern.⁷⁰ ROS entstehen bei der Reduzierung von molekularem Sauerstoff. Die Reaktionskette läuft ausgehend von molekularem Sauerstoff über das Superoxidanion (Dioxid1-), welches durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. Wasserstoffperoxid kann entweder zu Wasser oder zu einem Hydroxylradikal umgesetzt werden.⁷¹ Allen diesen Reaktionsprodukten ist ihre hohe Bereitschaft chemische Reaktionen einzugehen gemeinsam. Physiologischerweise werden z.B. durch die NADPH-Oxidase der Zellmembran, durch die Xanthindehydrogenase⁷² oder in der Endoxidation der Atmungskette bei der Reduzierung des Sauerstoffs durch die Übertragung von Elektronen zur Synthese von ATP in den Mitochondrien kontinuierlich ROS produziert und sind für die Sauerstoffhomöostase sogar notwendig. Erst wenn dieses Gleichgewicht aus den Fugen gerät, können schädliche

⁶⁶ Vgl. Lee, J.-W. et al., Hypoxia-inducible factor, 2004, S. 1–12.

⁶⁷ Vgl. Guillemin, K. et al., The hypoxic, 1997, S. 9–12; vgl. dazu auch Jiang, B. H. et al., Hypoxia-inducible factor, 1996, S. C1172-80.

⁶⁸ Vgl. Lee, J.-W. et al., Hypoxia-inducible factor, 2004, S. 1–12.

⁶⁹ Vgl. Guzy, R. D. et al., Oxygen sensing, 2006, S. 807–819.

⁷⁰ Vgl. Kuznetsov, A. V. et al., Mitochondrial ROS, 2011, S. 2383–2390; vgl. dazu auch Turrens, J. F., Mitochondrial formation, 2003, S. 335–344; vgl. dazu auch Lopez-Barneo et al., Cellular mechanism, 2001, S. 259–287.

⁷¹ Vgl. Bunn, H. F. et al., Oxygen sensing, 1996, S. 839–885.

⁷² Vgl. Duranteau, J. et al., Intracellular signaling, 1998, S. 11619–11624; vgl. dazu auch Yokoyama, Y. et al., Circulating xanthine, 1990, S. G564-70.

Folgen resultieren, wie dies z.B. bei der Reperfusion eines ischämischen Areals passiert (so genannter Reperfusionsschaden; die erneute Versorgung eines ischämischen Areals mit Sauerstoff führt zu einem Anstieg der ROS Produktion).⁷³ Unter physiologischer Hypoxie werden trotz des verminderten Sauerstoffangebots erhöhte ROS-Konzentrationen in den Mitochondrien (produziert über die Atmungskette) gemessen, was Guzy et al. dazu veranlasste, diesen ebenfalls Sauerstoff messende Eigenschaften (ähnlich dem Glomus caroticum) zuzuschreiben und sinkende Sauerstoffkonzentrationen über eine Signalkaskade mit Hemmung der Prolylhydroxylasen über HIF an die Zelle weiterzugeben. Unter Anoxie funktioniert dieser Mechanismus nicht mehr, hier wird angenommen, dass die Prolylhydroxylasen direkt ohne die Beteiligung der Atmungskette in den Mitochondrien gehemmt werden.⁷⁴ Für die *in vitro* Untersuchung verschiedener Zelllinien unter Hypoxie gibt es unterschiedliche Ansätze, so z.B. das Oxygen-Glukose-Deprivations-Modell nach Goldberg/Choi (1993)⁷⁵, in dem eine N₂/H₂/CO₂ begaste Kammer und Glukose freie Hypoxielösung verwendet werden oder das Modell nach Kusumoto et al. (1996)⁷⁶, in dem Argon und Deoxyglukose Verwendung finden. Beispiele für Variationen dieser Protokolle sind nachfolgend aufgelistet: so untersuchten Ala et al.⁷⁷ die Expression von Interleukinen produziert von HUVEC unter hypoxischen Bedingungen über eine Kammer, in der die Anteile der Gase CO₂, O₂ und N₂ variiert wurden. Die Dauer dieser Hypoxie betrug fünf Stunden, die Reoxygenierung 19 Stunden. Kürzere Hypoxiezeiten erwiesen sich als ineffektiv. Ähnlich verfahren Abaci et al.⁷⁸ Die Hypoxie wurde über eine CO₂-Atmosphäre in einem Inkubator erzeugt, Stamm-, Progenitor- und Endothelzellen wurden über 72 Stunden untersucht. In der hier vorliegenden Studie wird ein modifiziertes Protokoll nach Goldberg/Choi verwendet, welches in Kapitel 3.5.6 näher besprochen wird.

1.5 Zellkulturverfahren

Dieses Kapitel basiert auf den in der Fußnote angegebenen Quellen.⁷⁹ Die Anfänge der Zellkultur lassen sich bis ins 19./20. Jahrhundert zurückverfolgen, gleichwohl die

⁷³ Vgl. Kuznetsov, A. V. et al., Mitochondrial ROS, 2011, S. 2383–2390.

⁷⁴ Vgl. Guzy, R. D. et al., Oxygen sensing, 2006, S. 807–819.

⁷⁵ Vgl. Goldberg, M. P. et al., Combined oxygen, 1993, S. 3510–3524.

⁷⁶ Vgl. Kusumoto, M. et al., Susceptibility of, 1996, S. 1613–1621.

⁷⁷ Vgl. Ala, Y. et al., Hypoxia/reoxygenation, 1992, S. 134–139.

⁷⁸ Vgl. Abaci, H. E. et al., Adaptation to, 2010, S. C1527–37.

⁷⁹ Vgl. Minuth, W. W., Von der Zellkultur, 2002; vgl. dazu auch Freshney, R. I. et al., Tierische Zellkulturen, 1990; vgl. dazu auch Freshney, R. I., Culture of, 2010.

meisten heute verwendeten Medien und Zelllinien aus den 50er und 60er Jahren stammen und hauptsächlich auf die Proliferation der in Kultur befindlichen Zellen abzielen. Zu unterscheiden ist zwischen einer Primärkultur, bei der Zellen eines Organs bzw. eines Gewebes nach enzymatischem Aufschluss direkt in Kultur genommen werden, und einer Zelllinie, bei der die auswachsenden Zellen über einen langen Zeitraum hinweg immer wieder passagiert, d.h. auf neue Schalen übertragen werden. Eine Primärkultur ist ab der ersten Subkultivierung eine Zelllinie. Die Medien zur Kultivierung sind in ihren Inhaltsstoffen mittlerweile auf verschiedene Zelltypen abgestimmt, in ihren Grundsätzen aber ähnlich: sie enthalten u.a. Glukose, Aminosäuren, Salze und Vitamine. Um den pH-Wert der Kultur stabil zu halten, werden den Medien Puffer zugesetzt (z.B. HEPES oder Natriumhydrogencarbonat) und gegebenenfalls die Brutschränke mit CO₂ begast. Ein hoher CO₂-Partialdruck bedeutet vereinfacht eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zwischen CO₂ und Wasser in Richtung Protonen und damit zu einem sauren pH. Grundsätzlich liegen optimale pH-Werte einer Kultur zwischen 7,2 und 7,4, allerdings differieren diese Werte je nach kultiviertem Zelltyp. Zellen in Kultur besitzen ein typisches Wachstumsverhalten, charakterisiert durch die lag-Phase direkt nach dem Passagieren der Zellen, die log-Phase, in der die Zellen ein logarithmisches Wachstumsverhalten zeigen, und die Plateauphase, in der kein Wachstum mehr zu verzeichnen ist. Bei nicht kontinuierlichen Zellkulturen kommt es anschließend zu vermehrtem Zelluntergang. Diese Wachstumsphasen sind neben dem Proliferationsverhalten auch morphologisch an der Ausrichtung der Zellen auf dem Kulturschalenboden zu erkennen. Zu Beginn und im Laufe der log-Phase sind die Zellen i.d.R. ungeordnet und nicht konfluent, wohingegen sie im Übergang zur Plateauphase eine geordnete Ausrichtung annehmen und dicht nebeneinander liegen. Zellen können entweder adhärent, d.h. auf dem Zellboden in einem Monolayer haftend, oder in der Kultur schwimmend gezüchtet werden, letzteres mit dem Vorteil, dass in einer dreidimensionalen Anordnung kultiviert wird, was der Situation *in vivo* relativ nahe kommt. Adhärente Kulturen lassen sich durch die Beschichtung des Kulturgefäßbodens beeinflussen. In dieser Studie werden Primärkulturen u.a. aus humanem und murinem Herzgewebe in adhärenenten Zellkulturen angelegt. Verwendet werden u.a. Primaria™-Kulturschalen, die durch stickstoffhaltige Molekülgruppen bzw. durch die Verteilung der positiv und negativ geladenen Molekülgruppen die Anheftung verschiedenster Zellen aus Primärkulturen

verbessern sollen. Die Anlagerung von Bindegewebszellen soll nach Minuth⁸⁰ benachteiligt sein. Außerdem kommen manuell beschichtete Poly-L-Lysin und industriell beschichtete Poly-D-Lysin Schalen zum Einsatz. Die Primärkulturen werden aus Gewebestückchen angelegt, aus denen nach wenigen Tagen Zellen herauswachsen. Bei heterogenen Gewebeexplantaten geschieht diese Auswanderung der Zellen in einer bestimmten Reihenfolge: So erscheinen zunächst Leukozyten, dann Fibroblasten und zuletzt Endothelzellen. Problematisch bei einer solchen Kultur ist auch hier die Dedifferenzierung der Zellen.⁸¹

1.6 Fragestellung

Die Erläuterungen der verschiedenen Zellpopulationen zeigen, wie schwierig eine genaue Charakterisierung einer Primärkultur ist und wie kontrovers das regenerative Potential des Herzens diskutiert wird. Aufgaben dieser Studie sind demnach

1. die Überprüfung der kultivierten Zellen über morphologische Dokumentation, Selektionsschritte (magnetische Separierung über Beads, Klonierungszylinder u.a.) und Kultivierung von Vergleichspopulationen (Endothelzellen, Fibroblasten),
2. die Charakterisierung der kultivierten Zellen nach Variation des Kultivierungsprotokolls,
3. die Untersuchung der Zytokinzusammensetzung der konditionierten Überstände unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie und
4. die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der funktionellen Parameter im Zellverkürzungsmodell adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte durch diese konditionierten Überstände.

⁸⁰ Vgl. Minuth, W. W., Von der Zellkultur, 2002.

⁸¹ Vgl. Minuth, W. W., Von der Zellkultur, 2002.

2. Material

2.1 Chemikalien

100bp DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt/Main
10x Cell Lysis Buffer	peqlab, Erlangen
2x KAPA SYBR Fast qPCR MasterMix	peqlab, Erlangen
5-Azacitidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5x RT-Puffer	Invitrogen, Darmstadt
AA/BA	Serva, Heidelberg
ABsolute QPCR SYBR [®] Green Mix	ABgene, Hamburg
Agarose	qbiogene, Heidelberg
Animal Free Blocker	Vector Laboratories, Linaris, Dossenheim
APS	Roth, Karlsruhe
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
B27 Supplement	Gibco [™] Invitrogen, Darmstadt
Benzonase [®]	Merck, Darmstadt
bFGF (human, recombinant)	Invitrogen, Darmstadt
BPB	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Cardiotrophin (rm CT-1)	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citifluor	Agar Scientific, UK
DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM	Sigma, Steinheim
DMSO	Sigma, Taufkirchen
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
EGF	Calbiochem, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Entellan [®]	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe

FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
GelRed™	VWR, Darmstadt
Gibco™ Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hoe	Sigma, Taufkirchen
IMDM	Biochrom, Berlin
Isofluran Baxter	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ II	Biochrom, Berlin
L-Glutamin (200mM 100x)	PAA Laboratories, Cölbe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Minutil®	Ecolab, Düsseldorf
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
N ₂	Linde, Pullach
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt
NBT/BCIP Tablets	Roche, Mannheim
Oligo-dt	Roche, Mannheim
PBS	Bioline, Luckenwalde
peqGold TriFast™	peqlab, Erlangen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen

Primocin™	InvivoGen, USA
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Protein Ladder (Spectra™, Multicolor Broad Range)	Fermentas, St.Leon-Rot
Rhodamine 110-phalloidin	Biotium, VWR, Darmstadt
RNasin	Promega, Mannheim
Softasept® N	Braun, Melsungen
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
SDS Pulver	Serva, Heidelberg
SYBR® Safe DNA Gel stain	Invitrogen, Karlsruhe
TCA	Merck, Darmstadt
Temed	Serva, Heidelberg
TGF-β	Calbiochem, Darmstadt
Thrombin (bovine, high Activity)	Calbiochem, Darmstadt
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
Tween® 20	Sigma, Taufkirchen
β-Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchen

Alle übrigen Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) und Calbiochem (Darmstadt). Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in der jeweils höchsten Qualität bezogen, nach Herstellerangaben gelöst und entsprechend aufbewahrt.

2.2 Lösungen, Medien und Puffer

Allgemein

1x PBS (1 Tablette pro Liter a.b.)

Phosphat	0,01mol/l
KCl	0,0027mol/l
NaCl	0,14mol/l
pH7,4 bei 25°C	

PCR

100bp-Marker

100bp DNA Ladder	50µl
------------------	------

TAE-Auftragspuffer	100µl
1xTAE	580µl

50x TAE

Tris-Acetat	2,0mol/l
EDTA	0,05mol/l
pH 8,3	

cDNA-Mix

5x RT-Puffer	2µl
Oligo dt (8nm \pm A ₂₆₀ units)	1µl
dNTPs 100mM	1µl
DTT 0,1M	0,5µl
RNasin [®] 40U/µl	0,2µl
M-MLV-RT 200U/µl	0,3µl

PCR-Reaktionsansatz

SYBR Mix (in µl)	10 x Anzahl der Proben
Primer (in µl)	0,6x Anzahl der Proben
a.b. (in µl)	6,4x Anzahl der Proben

TAE-Auftragspuffer

10x TAE	xml
BPB	Spatelspitze/10ml
Glycerin	50 Vol.-%

Western Blot

Anodenpuffer (Roti [®] -Blot A)	Roth, Karlsruhe
Kathodenpuffer (Roti [®] -Blot K)	Roth, Karlsruhe
NBT/BCIP Tablets	Roche, Mannheim
Rapid Step [™] ECL Reagent	Calbiochem, Darmstadt
Super Signal [®] (West Pico Chemiluminescent Substrate)	Thermo Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn

5xLaufpuffer

a.b.	ad 5l
Glycerin	360g
Tris	75g

SDS	25g
-----	-----

10x TBS

Tris/HCl	12,114g/l
----------	-----------

NaCl	87,66g/l
------	----------

pH 7,4	
--------	--

AP-Puffer

Tris	100mmol/l
------	-----------

MgCl ₂	5mmol/l
-------------------	---------

NaCl	10mmol/l
------	----------

pH 9,55	
---------	--

2x Laemmli-Puffer:

Tris/HCl	0,125mol/l
----------	------------

Glycerol	20 Vol.-%
----------	-----------

SDS (10%ig)	4 % Gew.-%
-------------	------------

2-mercaptoethanol	10 % Vol.-%
-------------------	-------------

Bromphenolblau	0,004 % Gew.-%
----------------	----------------

pH 6,8	
--------	--

Probenpuffer

a.b.	80 Vol.-%
------	-----------

Glycerin + BPB (gesättigt)	20 Vol.-%
----------------------------	-----------

Sammelgel

AA/BA	1,2ml
-------	-------

SGP	2,5ml
-----	-------

a.b.	6,4ml
------	-------

SDS	0,05ml
-----	--------

APS	0,1ml
-----	-------

TEMED	0,012ml
-------	---------

SGP

Tris/HCl	0,5mol/l
----------	----------

pH 6,8	
--------	--

Trenngel

7,5%

12,5%

15%

AA/BA	7,5ml	12,5ml	15ml
TGP	7,5ml	7,5ml	7,5ml
a.b.	15ml	10ml	7,5ml
SDS	0,3ml	0,3ml	0,3ml
APS	0,2ml	0,2ml	0,2ml
TEMED	0,025ml	0,025ml	0,025ml

TGP

Tris/HCl	1,5mol/l
pH 8,6	

Zellkultur*EDTA-Puffer (5l)*

NaCl	36,55g
KCl	0,98g
KH ₂ PO ₄	0,83g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	1,45g
HEPES	11,90g
EDTA-Na ₂	0,93g
pH 7,4	

EMFI-Medium

DMEM	500ml
Glutamin	6ml
NEA	6ml
Penicillin	2,5ml
Hi FCS	60ml

Lysispuffer

Tris/HCl	50mmol/l
SDS	2 Gew.-%
pH 6,7	

Lysismix

Lysispuffer	800µl
β-Glycerophosphat (0,4M)	100µl
DTT (1M)	100µl
Natriumvanadat (0,1M)	10µl

Zellkulturmedium vor Trypsinierung

IMDM	xml
FCS	10 Vol.-%
Penicillin (5000U/ml) Streptomycin (5000µg/ml)	2 Vol.-%
L-Glutamin	2mmol/l
2-mercaptoethanol	0,1mmol/l

Zellkulturmedium nach Trypsinierung

DMEM	65 Vol.-%
IMDM	35 Vol.-%
FCS	8,3 Vol.-%
B27	2 Vol.-%
Penicillin (5000U/ml) Streptomycin (5000µg/ml)	2 Vol.-%
L-Glutamin	2mmol/l
EGF	10ng/ml
bFGF	20ng/ml
Thrombin	0,1U/ml
Cardiotrophin (1µg/100µl)	0,1 Vol.-%
2-mercaptoethanol	0,1mmol/l

Zellverkürzung*Ausplattiermedium/Waschmedium*

CCT	xml
PenStrep (100 IE/ml / 100µg/ml)	2 Vol.-%

Kollagenase-Stammlösung:

Kollagenase (Masse chargenabhängig)	25mg
Powell-Medium	5ml
CaCl ₂ (100 mmol/l)	12,5µl

CCT – Medium

M199	10l
HEPES	36g
Creatin	5mmol/l
Carnitin	2mmol/l
Taurin	5mmol/l
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10µmol/l
pH 7,4	

Powell-Medium:

NaCl	110mmol/l
KCl	2,5mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2mmol/l
Mg ₂ SO ₄	1,2mmol/l
NaHCO ₃	25mmol/l
Glukose	11mmol/l

Vorplattiermedium

CCT	xml
Penicillin (5000U/ml) Streptomycin (5000µg/ml)	2 Vol.-%
FCS	4 Vol.-%

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengenangaben auf die Herstellung eines einfachen Ansatzes.

2.3 Antikörper

Primäre Antikörper

Aktin (produced in rabbit)	Sigma, Taufkirchen
Cardiac actin (produced in mouse)	ProGen, Heidelberg
CD31 (produced in mouse, monoclonal)	Cell Signaling, Frankfurt/Main
c-Kit (produced in mouse)	BioLegend GmbH, Fell
FSP1 (produced in goat)	Sigma, Taufkirchen
GATA4 (produced in rabbit)	Sigma, Taufkirchen
isl-1 (produced in rabbit, polyclonal IgG)	Santa Cruz, Heidelberg
Nkx-2.5 (produced in rabbit, polyclonal)	Santa Cruz, Heidelberg
sca-1 (produced in rat, anti-mouse sca-1IgG)	BD Pharmingen™, Heidelberg
Troponin I (produced in rabbit, polyclonal)	Cell Signaling, Frankfurt/Main
Vimentin (produced in mouse, monoclonal)	Calbiochem, Darmstadt
Vimentin (produced in rabbit, polyclonal)	Cell Signaling, Frankfurt/Main
vWF (produced in goat, polyclonal IgG)	Santa Cruz, Heidelberg
β-MHC (produced in mouse, monoclonal)	abcam, UK

Sekundäre Antikörper/Toxine

Anti-rat IgG AP	Sigma, Taufkirchen
Cy3 Rabbit Anti-rat	Sigma, Taufkirchen
Cy3 Sheep Anti-mouse F(ab') ₂	Sigma, Taufkirchen

Cy5 Goat Anti-rabbit	dianova, Hamburg
Cy TM 2 Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research, Europe dianova, Hamburg
Cy TM 3 Donkey Anti-goat F(ab') ₂ IgG	Jackson Immuno Research, USA dianova, Hamburg
Donkey Anti-goat AP	Santa Cruz, Heidelberg
Donkey Anti-goat HRP	Jackson Immuno Research, USA
Donkey Anti-goat IgG FITC	Sigma, Taufkirchen
Goat Anti-mouse HRP	Affinity Biologicals, Kanada
Goat Anti-rabbit AP	Sigma, Taufkirchen
Goat Anti-rat IgG HRP	Cell Signaling, Frankfurt/Main
Sheep Anti-mouse AP	Sigma, Taufkirchen
Sheep Anti-mouse F(ab') ₂ FITC	Sigma, Taufkirchen
Sheep Anti-rabbit HRP	Affinity Biologicals, Kanada
Rhodamine-Phalloidin	Biotium, VNR, Darmstadt

2.4 Primer

Name	Annealing Temperatur	Produktgröße	Sequenz
c-Kit	61°C	126bp	forward: 5'-CCACTGGCAGTACAGAAGCA-3' reverse: 5'-TGA CT TACGACAGGCTCGTG-3'
isl-1	60°C	157bp	forward: 5'-AGCTACAGGACAGGCCAAGA-3' reverse: 5'-AAACAGGAGCTCCAGCAAAA-3'
FSP1	64°C	161bp	forward: 5'-CTTGGTTTGATCCTGACTGCTGTCA-3' reverse: 5'-AAGAAGCTGGGCAGCTCCCG-3'
hppt	61°C	120bp	forward: 5'-ATGCTGAGGATTTGAAAGGG-3' reverse: 5'-GCACACAGAGGGCTACAATG-3'
hppt	61°C	199bp	forward: 5'-GCAGCCCTGGCGTCGTGATT-3' reverse: 5'-CCCTTGAGCACACAGAGGGC-3'
sca-1	61°C	103bp	forward: 5'-GTGGTCTGAATGACCGTGTG-3' reverse: 5'-GTGAAGCCTCCCCTTCTACC-3'
Troponin I	62°C	225bp	forward: 5'-CTAGGCAGAGGGAACAGCAC-3' reverse: 5'-GGCTCCCAGTCTAGGCTTCT-3'
VEGFA	66°C	198bp	forward: 5'-GAGCCGGGCAGGAGGAAGGA-3' reverse: 5'-GCCCTCCGGACCCAAAGTGC-3'
Vimentin	68°C	100bp	forward: 5'-TGTCTCGTCCTCCTACCGCAGG-3' reverse: 5'-CTGTAGGTGCGGGTGGACGTAGT-3'

Alle Primer wurden von Invitrogen, Darmstadt bezogen.

2.5 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Allgemein

Brutschrank (Heraeus BDD 6220)	Thermo Scientific, Hanau
Demineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
FireboyPlus	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Glasware	Schott, Mainz
Laborwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Magnetheizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	HANNA® instruments, Kehl am Rhein
Pipet Boy Comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Biometra, Göttingen
Sterilbank (Hera Safe, Heraeus)	ThermoScientific, Hanau
Vakuum-Pumpe Vacusafe	IBS INTEGRA Biosciences, Fernwald
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad (AQUALine AL18)	LAUDA, Lauda-Königshofen
Zentrifugen (Allegra6, Allegra21, Microfuge18)	Beckman Coulter, Krefeld

Immunfluoreszenz

Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence, Neu-Isenburg
Konfokales Mikrosop (Axiovert 200M)	Zeiss, Oberkochen

PCR und Agarosegele

Drucker	Sony, UK
Elektrophoresekammer (Agagel Midi-Wide/Mini)	Biometra, Göttingen
iCycler	BioRad, München
Precellys Keramik Kügelchen	peqlab, Erlangen
Mikrowelle Lunik 850N	Unirop GmbH, Fürth
NanoDrop® Spectrophotometer ND-100	peqlab, Erlangen
Netzgerät (PowerPack P25)	Biometra, Göttingen
Pellet Pestle®	Sigma, Taufkirchen
Pellet Pestle® Motor	Sigma, Taufkirchen
Precellys	bertin Technologies, Frankreich
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht

ThermoCycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
Thermostrip	ThermoScientific, USA
UV Stratalinker® 2400	Stratagene®, Niederlande
UV-Tisch	peqlab, Erlangen
VWR labdancer	VWR, Darmstadt

Proteinbestimmung

Microplate-Reader (infinite M200)	Tecan®, Crailsheim
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
Thermoblock Dri-Block DB.2D	Labtech International, UK

Gelelektrophorese/Western Blot

Blotkammer	biotec-Fischer, Reiskirchen
Chemilumineszenz-System	peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	biotec-Fischer, Reiskirchen
Flachbettscanner (ScanJet4c)	Hewlett Packard, Böblingen
Glasplatten	Biometra, Göttingen
Kämme	Biometra, Göttingen
Klemmen	Biometra, Göttingen
Microliter™ Syringe	Hamilton, Schweiz
Netzgerät (High Voltage Power Pack P30)	Biometra, Göttingen
Nitrocellulose-Membran (Protran®)	GE Healthcare, München
PVDF-Membran (Immobilon-P ^{SO})	Millipore, Schwalbach
Spacer	BiotecFisher, Reiskirchen
Thermoblock Dri-Block DB.2D	Labtech International, UK
Ultraschallgerät (Sonopuls GM70)	Bandelin, Berlin

Zellkultur

BD BBL Dry Anaerobic Indicator Strips	BD, Heidelberg
BD GasPak-EZ Behältersysteme	BD, Heidelberg
DowCorning® high-vacuum silicone grease	Sigma-Aldrich, Steinheim
DSB-X™ Biotin Protein Labeling Kit	Invitrogen, Darmstadt
Dynabeads® FlowComp™ Flexi	Invitrogen, Darmstadt

DynaMag™-15	Invitrogen, Darmstadt
GasPak EZ Sachets	BD, Heidelberg
Klonierungszylinder (37847-0000 Variety Pack)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Modular Incubator Chamber	billups, Rothenberg
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen
Okularstrichplatte	Olympus, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop (CKX41)	Olympus, Hamburg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Videokamera mit Adapter (CCD; CMA-D5CE)	Sony, Berlin
VWR Tube Rotator	VWR, Darmstadt

Zellverkürzung

Brutschrank (Modell 400)	Memmert, Schwabach
Exsikkator	Duran, Wertheim/Main
Interface	Scientific Instruments, Heidelberg
Mikroskop (Nikon TMS)	Nikon, Düsseldorf
Nylonnetz (Polyamid, 200µm)	NeoLab, Heidelberg
Observation Monitor	Philips, Hamburg
Oszillograph (GoldStar OS-9020A)	Scientific Instruments, Heidelberg
Perfusionsanlage nach Langendorff	Eigenbau, Physiologisches Institut, JLU, Gießen
Power Supply	
Schlauchpumpe	ISMATEC, Schweiz
Stimulator T	Sachs Elektronik, March-Hugstetten
TissueChopper Mc Ilwain	GALA instruments, Bad Schwalbach
Wasserbad (LAUDA C6)	LAUDA, Lauda-Königshofen
Zeilenkamera	Scientific Instruments, Heidelberg

Zytokinarray

Chemilumineszenz System	Bio-Rad, München
Zytokinarray	
(RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array I)	Hölzel Biotech, Köln

2.6 Verbrauchsmaterial

BD Falcon™ Serological Pipet	BD, Heidelberg
CellScraper	Corning, Kaiserslautern
CoverSlips Deckgläser	Marienfeld, Lauda Königshofen
Durapore™	3M Health Care, Neuss
Einmalspritzen	B.Braun, Melsungen
Handschuhe	Ansell, München
Kulturschalen (Falcon® 353803, 353001, 353003, 353004)	BD, Heidelberg
Leukofix	BSN medical GmbH, Hamburg
Objektträger	R. Langenbrink, Emmendingen
Parafilm® M	VWR, Darmstadt (Alcan Inc. Packaging Division (Pechiney Plastic Packaging), USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen (10ml)	Greiner BioOne, Frickenhausen
Röhrchen (Falcon® 352070)	BD, Heidelberg
Skalpelle	VWR, Darmstadt (Feather®, Japan)
Sterilfilter (Millex® GP)	Millipore, Schwalbach
Sterillium®	Bode, Hamburg
Zellkulturmultiwellplatten	Greiner BioOne, Frickenhausen

2.7 EDV

Adobe Photoshop	Adobe Systems
Alpha DigiDoc RT2	Alpha Innotech (CellBiosciences), USA
BZ-Analyzer	Keyence, Neu-Isenburg
BZ-Observation	Keyence, Neu-Isenburg
CELL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

ChemiCapt 5000	Vilber Lourmat, Frankreich
Citavi 3.0	Swiss Academic Software, Schweiz
Cyberlink Power Director 4	Cyberlink
HP DeskScan II	Hewlett Packard, Böblingen
i-control	Tecan, Crailsheim
Image Quant	Molecular Dynamics
iQ™5, Version 2.0	BioRad, München
Laser Scanning Microscope LSM510	Carl Zeiss, Heidelberg
Magellan	Tecan, Crailsheim
Microsoft Office®	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Microsoft Windows® (XP, 7)	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
MuSoft	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
ND-100v3.5.1	Coleman Technologies
PASW Statistics 18	SPSS Inc, IBM Deutschland GmbH, München
Quantity One – ChemiDoc XRS	BioRad, München
QuantityOne	BioRad, München
STATISTICA	StatSoft® Europe GmbH, Hamburg

3. Methoden

3.1 Studiendesign und Herkunft des Zellmaterials

Das Herzgewebe zur Kultivierung der Zellpopulationen stammt sowohl von erwachsenen Menschen als auch von Kindern, die sich verschiedenen Operationen am Herzen mit Resektion von Gewebeanteilen des Vorhofs und/oder des Myokards an der Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie bzw. der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen unterziehen mussten. Indikationen für die Operationen waren z.B. angeborene Fehlbildungen (double outlet right ventricle, Fallot-Tetralogie), Stenosen oder Rhythmusstörungen. Das Gewebe der erwachsenen Personen befindet sich bis zur Kultivierung i.d.R. in der Blutkardioplegie-Lösung nach Buckberg.

Bis zum Ende dieser Studie wurden innerhalb der Arbeitsgruppe 108 Gewebeproben entgegengenommen, 62 Primärkulturen aus humanem Herzgewebe angelegt und 28 Herzgewebeproben als „Ganzherzproben“ bei -80°C eingefroren. 69 dieser Proben sind in unterschiedlicher Zusammenstellung in die Versuche zu dieser Studie eingegangen. Ergänzend wurden drei Primärkulturen aus Fibroblasten der Maus (gewonnen aus Mausembryonen), fünf Herz-Endothelzellkulturen der Ratte (Wistar, männlich, 3-4 Monate alt), eine Kultur eingefrorener Fibroblasten aus Arterien der menschlichen Lunge und drei humane Endothelzellkulturen aus der Nabelschnur (HUVEC) angelegt. Die humanen Fibroblasten wurden eingefroren, die humanen Endothelzellen bereits ausplattiert und passagiert von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Konstantin Mayer, Innere Medizin, FB11, JLU-Gießen übernommen. Zu der Verwendung der menschlichen Gewebe/Zellen bestehen Voten der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin (Antrag 29/01 Verwendung von Restmengen von Proben (HUVEC); Az 10/06 vom 19.01.2006 als Erweiterung zum Az 31/93 (humane Fibroblasten); Az 123/06 Bescheide vom 22.11.2006 und vom 03.02.2011 (Herzgewebe)) sowie im Falle der Herzgewebeproben die Aufklärung und Einwilligung der Patienten bzw. Sorgeberechtigten. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme zwischen 3,5 Monaten und 84 Jahren alt und unterschiedlich medikamentös vortherapiert; 45 Personen waren weiblichen, 63

männlichen Geschlechts. Angelegt wurde Gewebe des linken bzw. rechten Ventrikels, des Vorhofs bzw. Herzhors.

Die Kardiomyozyten für die Messung der relativen Zellverkürzung stammen von männlichen Wistarratten aus der hauseigenen Zucht des Physiologischen Instituts. Die Tiere haben ad libitum Zugang zu Wasser und dem Standardfutter Teklad Global 18% Prot. Rodent Diet von Harlan Europe.

3.2 Patientendaten

Erfasst wurden u.a. das Geschlecht, das Alter, die Herkunft des Gewebes, die Hauptdiagnosen, die Medikation und ggf. die Aortenabklemmzeit. Zusätzlich wurde, wenn möglich, die Zeit zwischen Entnahme und Beginn der Kultivierung notiert, um mögliche Korrelationen zwischen Versuchsergebnissen und Patient ziehen zu können. Einen Ausschnitt der Daten zeigt die folgende Tabelle:

Nr.	Name	Geb.datum	Herkunft	Hauptdiagnosen	Medikamente	Ischämiezeit/ Aortenabklemm- zeit in min
1	weiblich	2006	RVOT?	DORV, TGA, PFO, Pulmonalatresie	ASS, Plavix, D-Fluorette	148
4	männlich	1936	Herzohr	Aortenklappeninsuffizienz, KHK, Zweigefäßerkrankung, Vorhof- flimmern, Aorta ascendens Ektasie	Antiarrhythmika, β -Blocker, ACE-Hemmer, Diuretika, Antikoagulantien	82
5	männlich	1937	Herzohr	Dreigefäßerkrankung, Vorhofflim- mern	ACE-Hemmer, β -Blocker, Diuretika, Antikoagulantien, Ca^{2+} -Antagonisten	72
6	männlich	1949	Herzohr	Zweigefäßerkrankung, Vorhof- flimmern, Arterielle Hypertonie	β -Blocker, Antikoagulantien	41
7	weiblich	1965	LV	Subaortenstenose	Antihypertensiva	37
8	männlich	2009	RV			
9	männlich	2009	RVOT			
10	männlich	2009	RVOT			
11	weiblich	1930	Herzohr		β -Blocker, Diuretika, ACE-Hemmer, Gerinnungshemmer, Cholesterin- synthesehemmer, Muscarinrezeptoranta- gonist (COPD),	
12	männlich	2004	RV/RVOT?	Fallot-Tetralogie mit nicht vorhandener Pulmonalklappe, Di George Syndrom, Pulmonal- klappenstenose mit Insuffizienz (Contegra), dilatierter und hypertrophierter RV	β -Blocker, Diuretika, Antiasthmika	
13	männlich	1935	li. Herzohr		Gerinnungshemmer, β -Blocker, Magensäurehemmer, Cholesterin- synthesehemmer, Diuretikum	
14	männlich	1937	li. Herzohr		Amaryl (Diabetes Typ2), Gerinnungs- hemmer, β -Blocker, Diuretikum, ACE- Hemmer, Thyroxin, Magensäurehemmer, Amiodaron (Antiarrhythmikum), Zopiclon (Schlafstörungen)	
15	weiblich	1936	li. Herzohr + Ventrikel			
16	weiblich	2010	LV	HOCM		
17	weiblich	1928				
18	weiblich	1928	Herzohr	Arrhythmie, Dreigefäßerkrankung, Hypertonie, Hypotonie, Tricuspidalinsuffizienz, Vorhof- flimmern	β -Blocker, Diuretika, Digitalis	
19	männlich	1967	Herzohr	Zwei-/Dreigefäßerkrankung, Mitralklappeninsuffizienz, Aortenklappenstenose mit Insuf- fizienz, angeborene bicuspidale Aortenklappe, Vorhofflimmern	Antihypertensiva, Beta-Blocker, Antikoagulantien	
20	weiblich	2010	Myokard			
21	weiblich	1999	Myokard			

22	weiblich	1928	Herzohr	diastolische LV-Dysfunktion (Relaxationsstörung), Trikuspidalklappeninsuffizienz (Grad 3-4), permanentes Vorhofflimmern, Koronarsklerose, Mitralklappeninsuffizienz (Grad1), Aortenklappeninsuffizienz (Grad1), Pulmonalklappeninsuffizienz (Grad1), arterielle Hypertonie, COPD, Trigeminusneuralgie	Diuretikum (Aldactone, Torem), ASS, L-Thyroxin, Marcumar, Simvahehexal,	Aortenabklemmzeit: 51min
23	männlich	1937	Herzohr			
24	weiblich	1942	Herzohr			
25	männlich	1993	RV			
26	männlich	1943	li. Herzohr	VHF, RP, NIDDM	ASS, Bisoprolol, Carmon?, Delix, Marcumar, Novonorm, Simhexal, Torem, Siofor	
27	männlich	1948	li. Herzohr	Plasmozytom, AO-Klappen-Endokarditis,	CoDiovan, Jodid, L-Myroxin, dexane, Z.n. Strumektomie (?), Hypertonie	
28	männlich	1950	li. Herzohr	paroxysmales VHF, Herzinsuffizienz NYHA II, AS III°, AI I°	Innohep 0,5, Aldactone 25, Bisoprolol 5, Cordarex 200, Didimerck 0,07, Torem Cor 5	
29	männlich	2010	RV	DORV vom Fallot Typ	Calciumkanalblocker mit Gefäßselektivität, Gerinnungshemmer, ACE-Hemmer, Antidepressivum, β -Acetyldigoxin, Formoterol (Asthma), Prednisolon, Neuroleptikum, Cholesterinsynthesehemmer, Muskarinantagonist (COPD), Diuretikum	
30	männlich	2010			Gerinnungshemmer, Angiotensinantagonist, Diuretikum, β -Blocker, Schmerzmittel	
31	weiblich	2010	RVOT	subvalvuläre Stenose, TOF	β -Blocker	
32	weiblich	2007	LVOT	SAS, chronische Bronchitis, Asthma	NaCl-Inhalation	
33	männlich	1940				
34	weiblich	1935				
35	weiblich	1957				
36	männlich	1937	li. Herzohr	Aortenstenose, Koronare Eingefäßerkrankung, Vorhofflimmern, Hypertonie	Herzkranzgefäßdurchblutungssteigerung, β -Blocker, Diuretika, ASS	60
37	weiblich	2008	RV	Fallot, Stenose RVOT	β -Blocker	66
38	weiblich	2005	RVOT	PFO, VSD, Subpulmonalstenose, Double chambered Right Ventricle, RVOTO		73
39	männlich	2008	RVOT	VSD, Atresie der Pulmonalklappe, ASD, PDA, LPA-Stenose	Antikoagulantien, Clopidogrel	96 Bypass:155
40	weiblich	2006	RVOT	d-TGA, VSD, RVOTO, Pulmonalstenose, hypoplastische Pulmonalklappe, hypoplastischer Aortenbogen, In-Stent-Stenosen	ACE-Hemmer, β -Blocker, Diuretika, L-Thyroxin, Bisoprolol	Bypass 140
41	männlich	1996	RVOT	Fallot, Absent Pulmonary Valve, Pulmonalinsuffizienz	AB, Schilddrüsenhormone	Bypass 75
42	weiblich	1941	li. Herzohr	Mitralklappenstenose mit Insuffizienz, rechtsbelastetes Herz	Druckbelastung LA bei MS	48
43	männlich	1996	Subvalvulär ?	Subvalvuläre Aortenstenose		66
44	männlich	1994				
45	weiblich	2008	RV	Fallot, PDA, linkspersistierende obere Hohlvene		82
46	männlich	2003				
47	weiblich	1930				
48	männlich	1956	li. Herzohr	Mitralklappeninsuffizienz, Vorhofflimmern, linker dilatierter Vorhof	Antihypertensiva, ACE-Hemmer, Diuretika, Antikoagulation	63
49	männlich	1927	li. Herzohr	Koronare Dreifäßerkrankung, Aortenklappenstenose, Vorhofflimmern	Metoprolol (β -Blocker), Hydrochlorothiazid (Diuretikum), Ramipril, ASS, Neuroleptikum, Magensäurehemmer, Herzkranzgefäßdurchblutungssteigerung, Cholesterinsynthesehemmer,	
50	weiblich	1932				
51	weiblich	1936	Vorhof, LV	Vorhofmyxom, koronare Eingefäßerkrankung, COPD, Mitralklappeninsuffizienz, Vorhofflimmern, arterielle Hypertonie, chronische Niereninsuffizienz, Hyperparathyreoidismus	ASS, Isomeprazol, Simvastatin, Ramipril, Metoprolol, Ramipril/HCT	77
52	männlich	2008		Transposition der Arterien, dysplastische Pulmonalklappe, PDA, PFO, VSD (PA-Stenose), Koronaranomalie	Digoxin, Lasix, Fluorette, Diuretika, Digitalis, Antikoagulantien, Captopril, Spironolacton, Atenolol	86
53	weiblich	1956	Herzohr?	Dreifäßerkrankung, Vorhofflimmern, Lungenschaden	ACE-Hemmer, β -Blocker, Diuretika, Antiasthmatica, Antikoagulantien, Opioide, Antidiabetika	74
54	weiblich	1935	Herzohr	Mitralklappeninsuffizienz, Vorhofflimmern, Diabetes, Hypertonie	ACE-Hemmer, β -Blocker, Diuretika, Digitalis, Antikoagulantien	83
55	männlich	2008	RV			

56	männlich	1938	Herzohr		β-Blocker, Diuretikum, ACE-Hemmer, Bludrucksenker (Moxonidin)	
57	männlich	1953	li. Herzohr		Antidepressivum, Antiarrhythmikum, AT-Antagonist, Digitalisglykosid, Diabetesmedikamente	
58	weiblich	1944	Herzohr und Ventrikel		selektiver β-Blocker, Diuretikum, Thyroxin, Gerinnungshemmer	
59	männlich	1941	Herzohr		Gerinnungshemmer, Diuretikum, β-Blocker, ACE-Hemmer, Cholesterinsynthesehemmer	
60	männlich	1933	Herzohr			ca 1h zwischen OP und Anlegen
61	männlich	1941	Herzohr		Gerinnungshemmer, ACE-Hemmer, Diuretikum, Digoxin, Thyroxin, selektiver β-Blocker, Cholesterinsynthesehemmer,	
62	männlich	1927	Herzohr		Gerinnungshemmer, β-Blocker, Diuretikum, ACE-Hemmer, Durchblutungssteigerung Herz, Magensäurehemmer,	
63	weiblich	1930	?		= Zellreihe 11	
64	weiblich	1932	?		Schleimlöser, Gerinnungshemmer, β-Blocker, ACE-Hemmer, Antikonvulsivum, Schmerzmittel, If-Kanalhemmer, Cholesterinsynthesehemmer, Diuretikum	
65	weiblich	1960	Herzohr+Myokard		Gerinnungshemmer, Angiotensin antagonist, Diuretikum, β-Blocker, Schmerzmittel	
66	weiblich	1933	Herzohr			
67	männlich	1941	Hzohr			
68	männlich	1994	Ventrikel?			
69	männlich	1925	Herzohr			
70	weiblich	1935				
71	weiblich	2010	Myokard			
72	weiblich	1936	Herzohr			
73	weiblich	2005	LV	AI, SAS		

Darst. 2 Übersicht Patientendaten und Probenmaterial, AB= Antibiotikum, ACE= Angiotensin converting enzyme, AI = Aorteninsuffizienz, AO = Aorta, AS = Aortenstenose, ASD= Atrium-Septum-Defekt, ASS = Acetylsalicylsäure, AT-Antagonist = Angiotensin-Rezeptor-Antagonist, COPD = chronic obstructive pulmonary disease, DORV = double outlet right ventricle, d-TGA = D-Transposition der großen Gefäße, h = Zeitstunde, HCT = Hydrochlorothiazid, HOCM = hypertrophisch obstruktive Cardiomyopathie, If-Kanal = Funny-Kanal, KHK = koronare Herzkrankheit, LA=?, LPA = linke Pulmonalarterie, LV = linker Ventrikel, MS=?, NaCl = Natriumchlorid, NIDDM = non insulin dependency diabetes mellitus, NYHA = New York Heart Association, PA = Pulmonalarterie, PDA = persistierender Ductus arteriosus, PFO = persistierendes Foramen ovale, RP = Retinitis pigmentosa, RV = rechter Ventrikel, RVOT = right ventricular outflow tract, RVOTO= right ventricular outflow tract obstruction, SAS =Subaortenstenose, TGA = Transposition der großen Arterien, ToF = tetralogy of Fallot, VHF = Vorhofflimmern, VSD = Ventrikel-Septum-Defekt, Z.n. = Zustand nach

3.3 Kultivierung der Zellen und Gewinnung konditionierter Überstände

Das Protokoll nach Messina et al. bildet die Grundlage der Zellkultivierung in dieser Studie.⁸² Modifikationen in der Kultivierung bzw. beim Trypsinieren werden im Anschluss besprochen, alle Zellkulturarbeiten erfolgen unter einer Sterilbank, Ausnahmen werden kenntlich gemacht. Um Proben in Kultur nehmen zu können, müssen folgende Vorbereitungen getroffen werden: Zum Verdau des Gewebes werden 0,05g Kollagenase Typ CLS II (312U/mg) in 50ml Trypsin-EDTA (0,5%/0,2% in PBS) eingewogen, das „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“ bereitgestellt, beides im Wasserbad auf 37°C erwärmt und der TissueChopper mit 70%igem Ethanol gereinigt. Die Probe wird aus ihrem Transportbehälter genommen, auf Kulturschalen des Typs Falcon 353003 gelegt, mit kalter NaCl-Lösung bzw. 1xPBS-Lösung gespült bis sie blutfrei ist und anschließend mit dem Chopper in ca. 1-3mm³ kleine Stücke

⁸² Vgl. Messina, E. et al., Isolation and, 2004, S. 911–921.

zerteilt. Der Zellbrei wird in Schalen des Typs Falcon Primaria 353803 überführt und mit 1xPBS-Lösung erneut gespült. Dieses wird im Folgenden abgesaugt, durch 4ml der Trypsin-Kollagenase-Lösung ersetzt und die Kulturschale für fünf Minuten bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach erneutem Absaugen der Lösung, wird dieser Schritt noch zweimal wiederholt. Anschließend folgt die Zugabe und das anschließende Entfernen von 10ml „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“, um Trypsinrückstände zu entfernen. Die Zellkulturschale wird nunmehr mit 30ml „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“ versehen und für eine Woche lediglich auf Keimwachstum kontrolliert, bevor der regelmäßige Medienaustausch beginnt.

Die Kultivierungszeit lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Ab der Inkulturnahme der Proben bis zu ihrer Trypsinierung vergehen vier Wochen, in denen jeden zweiten Tag ein Wechsel der Hälfte des Mediums vorgenommen wird. Diese so genannten „konditionierten Überstände“ werden bis zu ihrer Verwendung zusammen mit einer bei jedem Mediumwechsel aliquotierten und mit im Brutschrank inkubierten Probe des reinen Zellkulturmediums bei -20°C eingefroren. In dieser ersten Kultivierungsphase bildet sich ein mehr oder weniger konfluenter Zellrasen aus, es finden sich Zellen verschiedener Morphologie (vgl. Ergebnisse) und mit unterschiedlichen Brechungsindizes, weshalb sie in der Phasenkontrastbetrachtung unterschiedlich hell leuchtend erscheinen. Nach vier Wochen erfolgt die enzymatische Loslösung der Zellen vom Kulturschalenboden, indem das Medium abgenommen wird, die Schalen je zwei Minuten mit 37°C warmer 1xPBS-Lösung und mit EDTA-Puffer gespült und anschließend mit 5ml Trypsin-EDTA für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert werden. Die PBS- und EDTA-Lösungen werden jeweils nach dem Waschschrift verworfen, mit der Trypsinfraktion wird weitergearbeitet. Sind die Zellen vom Kulturschalenboden abgelöst, wird die Suspension aus Zellen und Trypsin-EDTA mit einer Pipette in 20ml „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“, welches im Unterschied zum ersten Medium mit Zytokinen angereichert ist und bei Messina et al. als „cardiosphere-growing medium“ bezeichnet wird, überführt.⁸³ Es folgt die Übertragung auf Schalen des Typs Falcon 353004 (2ml/Schale) und/oder 353001(1ml/Schale), die zuvor manuell mit 500µl Poly-L-Lysin (0,01% Lösung) beschichtet und ca. eineinhalb Stunden

⁸³ Vgl. Messina, E. et al., Isolation and, 2004, S. 911–921.

getrocknet worden sind. Nach dem Ausplattieren der Zellen werden die Schalen für zwei weitere Wochen bis zu ihrem Erntezeitpunkt kultiviert, der Medienwechsel mit Gewinnung der konditionierten Überstände erfolgt auch hier alle zwei Tage. Wird das Material als „Ganzherzprobe“ eingefroren, geschieht dies nach Zerkleinerung und Portionierung des Gewebes in Kryoröhrchen oder Tubes, in denen sich Keramikkügelchen befinden, die die weitere Bearbeitung für die RNA-Isolierung ermöglichen. Die Proben werden im Anschluss in flüssigen Stickstoff transferiert und schließlich bei -80°C bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

Folgende Modifikationen werden im Laufe der Kultivierung der verschiedenen Primärkulturen vorgenommen:

1. Die Zerkleinerung mit dem TissueChopper ist eine mögliche Quelle mikrobiologischer Kontaminationen. Er wird ersetzt durch die manuelle Zerkleinerung der Gewebe mit sterilen Einmalskalpellen. Nach der Entnahme der Probe aus ihrem Transportbehälter, wird sie nacheinander in mehreren Kulturschalen des Typs Falcon 353004 mit kalter 1xPBS-Lösung gewaschen und Blutrückstände entfernt. Die Zerkleinerung erfolgt nun in einem der Schälchen mit sterilen Einmalskalpellen. Die Stücke sind im Durchmesser ca. 3mm groß und werden, nach der Trypsin-Kollagenasebehandlung und dem Waschen mit ca. 10ml „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“ zur besseren Haftung auf dem Kulturschalenboden angeordnet und für 30-60 Minuten auf der schräggestellten Schale getrocknet. Diese Form der Kultivierung erfolgt im Austausch mit Herrn Dr. Christian Volz, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg. Die Medien- und Trypsinreste werden abgesaugt und die Schale mit 30ml „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“ gefüllt. Die weitere Behandlung erfolgt analog der obigen Schilderung.

2. Die in dieser Studie durchgeführten Versuche und die nähere Charakterisierung der verschiedenen Zellmorphologien machen eine Umstellung des Trypsinierungsverfahrens mit einer Zellzählung notwendig. Das bedeutet, dass die Suspension aus 5ml Trypsin-EDTA nicht in das vorbereitete Zellkulturmedium überführt wird, sondern in ein Röhrchen, in dem 1ml FCS-Lösung vorgelegt ist. Die Kulturschale wird anschließend mit 4ml 1xPBS gespült und dieses ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Aus diesem werden nach vorsichtigem Schwenken $2 \times 10 \mu\text{l}$

genommen und eine Neubauer-Zählkammer mit doppelter Netzteilung, 0,1mm Tiefe und einer Fläche des kleinsten Quadrates von $0,0025\text{mm}^2$ beschickt. Während das Röhrchen für zehn Minuten bei 1200-2100rpm zentrifugiert wird, erfolgt die Zellzählung. Die Zellen werden anschließend mit der entsprechenden Menge „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“ resuspendiert und auf die vorbereiteten Schalen verteilt. Es werden 40000-70000 Zellen/ml abhängig von der Ergiebigkeit der Trypsinierung ausplattiert.

3. Um Zellen unterschiedlicher Morphologie separat kultivieren zu können, werden so genannte Klonierungszylinder eingesetzt. Diese werden zum Trypsinierungszeitpunkt nach Abnehmen des konditionierten Überstandes mit Hilfe eines sterilen Schmierfettes (DowCorning® high-vacuum silicone grease) auf einer Seite abgedichtet und über den gewünschten Zellbereich auf den Kulturschalenboden gedrückt. So ist es möglich, die Zellen innerhalb des Zylinders separat zu trypsinieren und auf eine neue Schale auszuplattieren.

4. Messina et al. beschreiben die Bildung so genannter „Cardiospheres“ (Kardiosphären), die sich aus den nach ihrem Protokoll kultivierten Primärkulturen, genauer aus Zusammenlagerungen von runden „phase bright cells“, entwickeln. Diese „phase bright cells“ werden laut Beschreibung in den ersten vier Wochen der Kultivierung über einem fibroblastenartigen Zellrasen sichtbar, können über die Trypsinierung abgenommen und auf mit Poly-D-Lysin beschichtete Schalen erneut ausplattiert werden, in denen sich dann die Kardiosphären bilden. In dieser Studie werden etwas allgemeiner abgrenzbare Zusammenlagerungen von Zellen als Kardiosphären bezeichnet; sie können je nach Brechungsindex hell leuchten, oder als dunklere kugelförmige Gebilde in der Kultur erscheinen. Die Bildung von Kardiosphären wird in dieser Studie zu unterschiedlichen Zeitpunkten dokumentiert (vgl. Ergebnisse). Es erfolgt keine Kultivierung in Suspension. Zudem werden Kultivierungsversuche mit diesen Kardiosphären auf Poly-D-Lysinschalen unternommen, indem sie nach ihrem Erscheinen unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Pipette abgesaugt und neu ausplattiert werden. Wie bereits erwähnt, werden die aus diesen Kardiosphären herauswachsenden Zellen im Gegensatz zu den Zellen, die die Kardiosphären formen („Cardiosphere forming cells“, CFC) als „Cardiosphere derived cells“ (CDC) bezeichnet.

5. Exemplarisch wurde der Versuch unternommen, eine Zellreihe nach zwei Wochen zu ernten (das Protokoll nach Messina gibt viermalige Separierung von CFCs an), also zu einem Zeitpunkt, zu dem der Zellrasen noch nicht konfluent ist, jedoch Zellen mit hohem Kern-Zytoplasmaverhältnis aufgetreten sind.

Es werden neben den Primärkulturen aus humanem Herzgewebe auch drei Fibroblastenkulturen der Maus angelegt. Diese werden in der dritten Passage nach dem Auftauen in EMFI-Medium kultiviert übernommen. Das Medium wird gegen das „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“ ausgetauscht, die Kultivierungsdauer bis zur Trypsinierung dem Alter der Zellen angepasst und anschließend nach dem Protokoll nach Messina et al. weiterverfahren.

Die Endothelzellen der Ratte werden während des Protokolls zur Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten aus einem Zentrifugationsschritt des Zellbreis gewonnen (vgl. Kapitel 3.5.1) und ebenfalls nach dem Protokoll für die humanen Primärkulturen kultiviert. Die HUVECS werden entweder in der 1. oder 2. Passage übernommen (das Kulturmedium enthält 5% FCS) und ebenfalls in Abhängigkeit des Alters der Kultur und in Anlehnung an das Protokoll nach Messina trypsinisiert und bis zur Ernte weiter kultiviert. Die humanen Fibroblasten werden eingefroren übernommen, für eine Woche in „Zellkulturmedium vor Trypsinierung“ kultiviert und anschließend nach dem bekannten Schema trypsinisiert und geerntet.

Für die nachfolgenden Versuche werden i.d.R. die konditionierten Überstände zum Erntezeitpunkt oder zum Trypsinierungszeitpunkt verwendet.

3.4 Charakterisierung und Dokumentation der Zellmorphologie

3.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Das Prinzip des Phasenkontrastes wurde von Frederik Zernike entwickelt, die nachfolgenden Erläuterungen beziehen sich auf seine Veröffentlichung und auf die in der Fußnote genannte Quelle.⁸⁴ Es dient dazu, so genannte „Phasen-Objekte“, d.h. Objekte, die transparent und deren Strukturen in normalen Lichtmikroskopen kaum zu erkennen sind, kontrastreich darzustellen. Beim Durchtritt von Licht durch diese

⁸⁴ Vgl. *Mulisch, M. et al. (Hrsg.), Romeis Mikroskopische, 2010; vgl. dazu auch Zernike, F., How I, 1955, S. 345–349.*

Objekte, wird es abhängig vom Lichtbrechungsindex des betrachteten Gegenstands in seiner Phase verändert. Die kontrastreiche Darstellung geschieht über eine kongruente Anordnung einer Ringblende und eines auf das Objektiv aufgebrannten Ringes. Dadurch wird das direkte Licht ebenfalls in seiner Phase verschoben und gedämpft. Aus der Kombination des am Objekt gebeugten Lichts und dem modifizierten direkten Licht entsteht ein kontrastreiches Bild, das Objekt erscheint dunkler auf einem helleren Hintergrund. Objekte mit einem hohen Brechungsindex erzeugen eine Umkehr dieser Verhältnisse: sie erscheinen hell leuchtend, bzw. mit einem Saum versehen („Halo-Effekt“).⁸⁵

Die Zellkulturen werden während der gesamten Kultivierungszeit über ein Phasenkontrastmikroskop in ihrer Entwicklung beobachtet und morphologische Unterschiede über eine auf den Tubus aufgebrachte Kamera an einen Computer mit entsprechender Bildbearbeitungssoftware übertragen. Größenmessungen erfolgen über eine Okularstrichplatte und ein Objektmikrometer.

3.4.2 Untersuchung der Zelllinien auf Zellmarker und strukturelle Proteine

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Untersucht wurden 23 Zelllinien (22 humane Herzgewebeproben, eine Kultur HUVEC) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zur Trypsinierung und zum Erntezeitpunkt, außerdem CFC und CDC separiert) und eine Herzgewebeprobe mit Proteingehalten von 50-100µg. Die Aufbereitung der Zelllinien erfolgt nach einem anderen Protokoll als die Aufbereitung der Herzgewebeprobe: Die Zelllinien wachsen zum Erntezeitpunkt auf Kulturschalen Typ Falcon 353004 bzw. 353001, zum Zeitpunkt der Trypsinierung auf Kulturschalen Typ Falcon 353003. Der konditionierte Überstand ist abgenommen und die Schalen sind mit 1xPBS-Lösung gewaschen worden. Anschließend werden 200-1000µl Lysismix in Abhängigkeit von der Größe der Schale auf selbige pipettiert. Nach zehn Minuten Inkubation auf einem Schüttler werden 10-50µl einer 1:30 Verdünnung der Benzonase[®] (100.000U/vial) je nach Schalengröße dazugegeben und erneut für fünf Minuten inkubiert. Die aufgeschlossenen Zellen werden nun mit einem sterilen Einmalschaber vom Kulturschalenboden abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Bis zu ihrer Verwendung werden die Proben bei -20°C eingefroren. Die Herzgewebeprobe wird

⁸⁵ Vgl. Mulisch, M. et al. (Hrsg.), Romeis Mikroskopische, 2010.

nach dem Protokoll der Firma Cell Signaling aufgearbeitet: Der 10x Ganzherzlysispuffer wird zu einem 1x Ansatz mit a.b. verdünnt, mit 0,1mol/l PMSF im Verhältnis 1:100 versetzt und zu den Herzgewebestücken in ein Röhrchen mit Keramikkügelchen dazugegeben. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgt mit dem Gerät Precellys für 2x 20 Sekunden bei 6000rpm. Anschließend werden die Proben zehn Minuten auf Eis inkubiert. Ist dies geschehen, erfolgt eine erneute Homogenisierung, dieses Mal mittels Ultraschall, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 14.000g für zehn Minuten. Der gewonnene Überstand wird in neue Reaktionsgefäße überführt und der Totalproteingehalt über den NanoDrop® bestimmt. Es erfolgt die Verdünnung der Proben entsprechend dem gewünschten Proteingehalt. Abschließend wird 2xLaemmli-Puffer im Verhältnis 1:5 zu den Proben hinzugegeben, bei 95°C gekocht und sie bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.4.2.2 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode, die von Shapiro, Laemmli u.a. im Detail beschrieben wurde.⁸⁶ Sie beruht auf der Eigenschaft von Proteinen, sich entsprechend ihres Molekulargewichtes und aufgrund ihrer Ladung unterschiedlich weit in einem mit SDS versetzten Polyacrylamidgel zu bewegen mit dem Ziel die Proteine so anhand ihres Molekulargewichtes voneinander zu trennen. Bei der hier verwendeten diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese werden ein Sammelgel und ein Trenngel, welche sich im pH-Wert und im Acrylamidgehalt unterscheiden, gegossen. Ersteres gleicht Füllhöhenunterschiede der Taschen aus, sorgt für eine Konzentrierung der Proben und ihren gleichmäßigen Eintritt in das Trenngel, in dem die einzelnen Proteine abhängig vom Acrylamidgehalt des Gels voneinander getrennt werden. Je höherprozentig das Gel angesetzt wird, desto enger ist das Gitter des Gels (das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid ist für die „Gitterstruktur“ des Gels entscheidend) und desto besser trennen sich Proteine mit kleinen kDa-Angaben. Das SDS dient der negativen Aufladung und der Denaturierung der Proteine in den Proben. Nachweise werden für Vimentin, CD31, vWF, FSP1, GATA4, Nkx-2.5, β -MHC, Aktin, α -actinin, Troponin, sca-1, c-Kit und isl-1 mit 28 verschiedenen Proben aus 13 Zelllinien durchgeführt.

⁸⁶ Vgl. *Laemmli, U.*, Cleavage of, 1970, S. 680-685 ; vgl. dazu auch *Smithies, O.*, An improved, 1959, S. 585–587; vgl. dazu auch *Shapiro, A. et al.*, Molecular weight, 1967, S. 815–820.

In einem ersten Schritt wird eine quadratische und eine Ohrenglasplatte mit Ethanol und Wasser gereinigt, die Spacer mit Wasser benetzt und im gewünschten Abstand auf die Ohrenglasplatte gelegt. Eine Gummidichtung entlang des Randes der Glasplatte verhindert das Auslaufen des Trenngels. Die beiden Glasplatten werden übereinandergelegt, mit Klammern befestigt und das Gel zwischen die Glasplatten gegossen. Wie hochprozentig das Gel ist, ist abhängig von dem nachzuweisenden Protein, in diesem Falle werden 7,5-15%ige Gele hergestellt. Um eine gleichmäßige Polymerisation des Trenngels zu ermöglichen, wird es bis zur Aushärtung (mindestens eine Stunde oder über Nacht) mit Wasser überschichtet. Ist dies geschehen, wird das Wasser dekantiert, die Gummidichtung entfernt, die Glasplatten an der Gelelektrophoresekammer befestigt, Sammelgel bis zum Rand der Glasplatten nachgefüllt, ein Profilformer zur Herstellung der Taschen eingesetzt und 20 Minuten bis zur Aushärtung des Sammelgels gewartet. In dieser Zeit werden die je nach Versuchsbedingungen in ihrem Proteingehalt über das Pierce[®] BCA Protein Assay Kit oder im NanoDrop[®] standardisierten Proben aufgetaut, bei 95°C für fünf Minuten gekocht und sofern sie nicht schon mit Laemmlipuffer versetzt sind, mit Auftragspuffer zur Beschwerung der Proben versehen. Die Kammer wird mit Laufpuffer befüllt, der Kamm entfernt und die Taschen gespült. Anschließend werden die Proben in gleicher Volumenmenge in die Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht bestimmen zu können, wird in eine Tasche ein Marker pipettiert, der Angaben zwischen 10 und 260kDa farblich abgrenzt. Die Kammer wird geschlossen und das Gel für ca. vier Stunden einer Spannung von 200V ausgesetzt.

Die geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden im „Semi-dry“ Verfahren, beschrieben u.a. von Kyhse-Andersen,⁸⁷ in einer Blotkammer (Edelstahl oder Graphit) auf eine Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran unterschiedlicher Porenstärke (0,2-0,45µm) übertragen. Dieses Verfahren wird in Anlehnung an den „Southern Blot“⁸⁸ als „Western blotting/Western Blot“⁸⁹ bezeichnet. Der horizontale Aufbau der Kammer erfolgt von der Anode (Pluspol, Kammerboden) zur Kathode (Minuspole, Kammerdeckel) über in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere, die ggf. in Methanol

⁸⁷ Vgl. Kyhse-Andersen, J., Electrophoretic transfer, 1979, S. 4350–4354.
Electrophoretic transfer, 1979, S. 4350–4354.

⁸⁸ Vgl. Southern, E. M., Detection of, 1975, S. 503–517.

⁸⁹ Vgl. Burnette, W. N., Western blotting, 1981, S. 195–203.

aktivierte (dies ist nur bei PVDF notwendig) und im Anodenpuffer geschwenkte Membran, das Gel und in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Luftblasen zwischen den Schichten werden mit einer Glaspipette vorsichtig herausgerollt, der Deckel mit Kathodenpuffer benetzt und auf das so entstandene „Blotsandwich“ gesetzt. Der Transfer beginnt mit dem Anschluss an das Netzgerät. Die Stromstärke richtet sich nach der Größe der Membran ($0,8 \text{ mA pro cm}^2$), die Blotzeit nach dem Molekulargewicht des Proteins bzw. den verwendeten Puffern (zwei bis drei Stunden). Nach dem „Blotten“ wird die Membran für eine Stunde mit 5%BSA in 1xTBS (Verdünnung des 10xTBS mit a.b.) plus 0,1% Tween[®] 20 geblockt.

3.4.2.3 Detektion der Proteine

Die Detektion der auf die Membran transferierten Proteine erfolgt über ein System aus Erst- und Zweitantikörper, die Verdünnungen richten sich nach den Herstellerangaben. Der Zweitantikörper ist entweder mit AP oder mit HRP gekoppelt. In dieser Studie wird zuerst die verstärkte Chemilumineszenz (ECL) und anschließend die Färbung mit AP durchgeführt. Das Enzym HRP setzt Luminol in Anwesenheit von Hydrogenperoxid zu Licht emittierenden Zwischenprodukten um. Diese Emission (im Maximum mit einer Wellenlänge von ca. 482nm) wird über das entsprechende Chemilumineszenzsystem detektiert. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Empfindlichkeit des Nachweises und in der berechenbaren optimalen Belichtungszeit vor Sättigung des Signals. Hingegen wird bei der AP-Färbung die Reaktion von BCIP und NBT zu einem rötlichblauen Farbstoff katalysiert, die Entwicklungszeit wird manuell bestimmt.⁹⁰ Die geblockten Membranen werden für zwei Stunden mit den jeweiligen zum Protein passenden Erstantikörpern inkubiert, anschließend dreimal mit 1xTBS plus 0,1% Tween[®]20 gewaschen und für eine Stunde mit dem Zweitantikörper versehen. Nach erneutem Waschen werden die Membranen für zwei Minuten mit gleichen Anteilen einer Luminol- und einer Peroxidlösung inkubiert, auf eine Glasplatte gelegt und in der von der Software ChemiCapt5000 berechneten Zeit belichtet. Nach der Detektion über HRP wird die AP-Färbung angeschlossen, d.h. die Membranen erneut gewaschen, für zwei Stunden mit dem AP-gekoppelten-Zweitantikörper inkubiert, gewaschen, für eine Minute in AP-Puffer und anschließend unter Lichtausschluss in die Entwicklerlösung (eine NBT/BCIP-Tablette/10ml a.b.) gelegt. Die Entwicklungszeit ist hier abhängig

⁹⁰ Vgl. Knecht, D. et al., Visualization of, 1984, S. 180–184.

von der Färbung des Hintergrundes: spätestens wenn dieser angefärbt wird, wird die Membran herausgenommen, in a.b. geschwenkt und getrocknet.

Die Auswertung erfolgt i.d.R. qualitativ, in dem mit Hilfe des Markers die Höhe der gesuchten Bande bestimmt wird. Soll quantifiziert werden, dient Aktin als Kontrollbande, auf die die anderen Proben bezogen werden. Die Intensitätsbestimmung erfolgt analog zum Zytokinarray über das Programm Image Quant, in dem eine Auswertungsmaske über die Kontroll- und die Probenbanden gelegt und das Adjusted Volume bestimmt wird.

3.4.3 Untersuchung der Zelllinien auf mRNA-Ebene

3.4.3.4 Vorbereitung der Proben

Für die Aufarbeitung der Proben in der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) werden sowohl geerntete Zellen (Normoxie, Hypoxie, CDC) als auch Herzgewebeproben verwendet. Insgesamt werden 114 Proben aus 61 verschiedenen Zelllinien bzw. Herzgewebeproben verarbeitet, hiervon sind 26 Proben Herzgewebe, jeweils drei Proben humane Endothelzellen bzw. humane Fibroblasten, 77 Proben Zellen zum Erntezeitpunkt und 11 Proben Zellen zum Trypsinierungszeitpunkt. Das Herzgewebe kann direkt zur Isolierung der RNA verwendet werden, die geernteten Zellen müssen erst vorbereitet werden: der konditionierte Überstand wird abgenommen, Aliquots hiervon 1:100 verdünnt und eingefroren, die Kulturschalen werden mit 600-1000µl (je nach Kulturschalengröße) gekühlter 1xPBS Lösung versetzt und mit einem Schaber vom Kulturschalenboden abgenommen. Die Suspension wird in Reaktionsgefäße gefüllt und bei 3500rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet und die Pellets bis zur RNA-Isolierung bei -80°C eingefroren.

3.4.3.5 RNA Isolierung über Phenol-Chloroformextraktion

Die Isolierung der RNA erfolgt in Anlehnung an das Protokoll der Firma peqlab, von welcher das Extraktionsreagenz (TriFast[®]) bezogen wird, als Guanidinisothiocyanat/Phenol-Chloroformextraktion. Beschrieben wurde die Methode von Chomczynski et al.⁹¹ Während der gesamten Prozedur werden die Proben mittels Eis gekühlt. Das Zellpellet aus der Zellernte wird mit 500µl Extraktionsreagenz versetzt und manuell mit einem Stabrührer (Pellet Pestle[®] Motor) trituriert; die

⁹¹ Vgl. Chomczynski, P. et al., Single-step method, 1987, S. 156–159.

Herzgewebestücke werden in Röhrchen mit Keramikugeln überführt, mit 1ml Extraktionsreagenz versetzt und über das Gerät Precellys 3x 20 Sekunden bei 6500rpm homogenisiert. Anschließend werden 50µl (Zellen) bis 200µl (Herzgewebe) Chloroform hinzugegeben und die Mischung bis zur Trübung gevortext. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 4°C und 12500rpm bilden sich drei Phasen im Reaktionsgefäß: die obere flüssige enthält die RNA, die mittlere DNA und die untere pinkfarbene Phase Phenol/Chloroform und Proteine bzw. ebenfalls DNA. Die obere Phase wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit gleichen Anteilen Isopropanol versehen und für mindestens 20 Minuten bei -20°C eingefroren. Die präzipitierte RNA wird anschließend über einen erneuten Zentrifugationsschritt in einem Pellet gesammelt, der Überstand verworfen und 1ml 70%iger Ethanol zum Auswaschen möglicher Isopropanolreste hinzugefügt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird der Ethanolüberstand verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 10-20µl a.b. (abhängig von der Größe des Pellets) aufgenommen, so dass es sich lösen kann.

3.4.3.6 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um ein optimales Verhältnis von cDNA-Mix und RNA-Gehalt zu erreichen, wird die RNA-Konzentration über ein Spektrophotometer (NanoDrop®) bestimmt und zunächst so mit a.b. verdünnt, dass die gemessene Konzentration zwischen 200 und 1000ng/µl liegt. Anschließend lassen sich die Proben in ausreichender µl Anzahl pipettieren, um in einem zweiten Verdünnungsschritt in neuen Reaktionsgefäßen eine Konzentration von 1µg/5µl aus RNA und Wasser herstellen zu können.

3.4.3.7 cDNA Synthese

Die RNA kann nicht direkt zur Amplifizierung eingesetzt werden, da die für die PCR verwendeten Polymerasen DNA-abhängig sind. Aus diesem Grund wird die RNA über eine reverse Transkriptase (M-MLV-RT) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Beschrieben haben das Verfahren der reversen Transkription u.a. Baltimore et al.⁹² Die in der richtigen Konzentration zusammenpipettierten Proben werden in einem Thermocycler für 15 Minuten auf 60°C erhitzt, um die RNA zu denaturieren. In dieser Zeit wird der cDNA-Mix angesetzt und nach Ablauf der 15 Minuten in gleicher Menge zu den Proben pipettiert. Die eigentliche cDNA-Synthese

⁹² Vgl. *Baltimore, D.*, RNA-dependent DNA, 1970, S. 1209–1211.

erfolgt über ein Cyclerprogramm, welches die Proben für eine Stunde bei 37°C inkubiert, dann für fünf Minuten auf 95°C erhitzt, um sie bis zur weiteren Verarbeitung bei 5°C zu halten. Die entstandene cDNA wird abschließend 1:10 mit a.b. verdünnt und bis zur PCR bei -20°C eingefroren.

3.4.3.8 RT-PCR

Die RT-PCR (Real time PCR bzw. Reverse Transkriptase-PCR) ist eine etwas abgewandelte Form der PCR wie sie Mullis et al.⁹³ entwickelt hat. Hierbei ist es durch die Verwendung eines fluoreszierenden Substrats, welches sich an doppelsträngige DNA lagert, möglich, im linearen Bereich der Amplifikation direkt zu quantifizieren. Für diese Studie interessiert allerdings die relative Expression eines Genes in Bezug auf die Expression eines Housekeeping-Gens (hprt), eine absolute Quantifizierung wird nicht durchgeführt. Die verwendeten jeweiligen forward und reverse Primer (c-Kit, sca-1, isl-1, VEGFA, Vimentin, FSP1, Troponin, hprt) werden mit a.b. (die Menge an a.b. orientiert sich an der Stoffmenge des Primers) angesetzt, zu gleichen Teilen zusammenpipettiert und wie die cDNA 1:10 verdünnt. Die Primer werden anschließend zusammen mit dem SYBR-Mix, der den Fluoreszenzfarbstoff (SYBRGreen), die Basen und die Polymerase enthält, und Wasser zum PCR-Reaktionsansatz zusammenpipettiert. Jeweils 3µl der Probe in Doppelbestimmung und 17µl des Mixes plus eine Doppelbestimmung mit Wasser und dem PCR-Reaktionsansatzes als Kontrolle werden nun in PCR-Strips zur Amplifizierung pipettiert und im Cycler platziert. Die eigentliche PCR folgt einem an den jeweiligen Primer angepassten Schema aus Denaturierung (die DNA-Stränge liegen nun einzeln vor), Annealing (der Primer lagert sich an den DNA-Strang an) und Elongation (die Basen werden durch die Polymerase an den Primer angelegt, der Strang wird Schritt für Schritt komplementiert). Die jeweiligen Annealingtemperaturen sind dem Primerdesign zu entnehmen. Das Schema des ablaufenden Programms ist wie folgt: Die „Hot-Start“-Polymerase wird bei 95°C für 15 Minuten aktiviert, es folgen 45 Wiederholungen bestehend aus Denaturierung (95°C für 30 Sekunden), Annealing (Primertemperatur, 30 Sekunden) und Elongation (72°C, 30 Sekunden). Den Abschluss bildet die Generierung der Schmelzkurve (50-100°C in 0,5°C Schritten, jeweils für 10 Sekunden) in 100 Wiederholungen. Das Erhitzen führt zum Zerfall der doppelsträngigen Produkte, so dass das Fluoreszenzsignal abnimmt. Die

⁹³ Vgl. Mullis, K. et al., *Specific enzymatic*, 1986, S. 263–273.

Schmelztemperatur ist abhängig von der Länge des entstandenen Produkts. Auf diese Weise kann überprüft werden, ob andere als die gewünschten Produkte während der Amplifizierung entstanden sind.

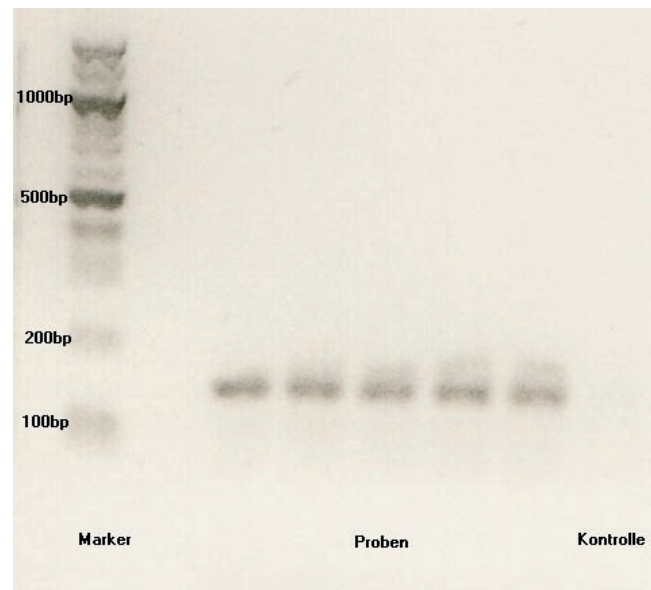
Die Auswertung erfolgt über die Zyklenzahlen, gemessen an einer von der Software gesetzten Schwelle, ab der die Fluoreszenzsignale gemessen werden konnten. Je kleiner die Zykluszahl ist, desto mehr Produkt ist entstanden, denn umso früher konnte ein ausreichend starkes Signal detektiert werden. Im Idealfall erfolgt eine Verdopplung der Produkte pro Zyklus, also ein exponentielles Wachstum der Produktmenge. Die Zyklenzahlen der untersuchten Sequenzen werden um das Housekeeping-Gen vermindert, Mittelwert, Median und Standardabweichung dieser neuen Zykluszahlen werden bestimmt, dann wird eine Kontrolle definiert, auf die die untersuchten Sequenzen bezogen werden, indem der Median dieser Kontrolle von allen anderen untersuchten Primern abgezogen wird. So entsteht eine Streuung um den Median, der naturgemäß in der Mitte der Werte liegt. Drückt man die relative Expression als Potenz aus ($2^{-(\text{Zykluszahl})}$), erhält man Werte, die um den Median der Kontrolle (d.h. um 1) streuen und kann somit ausdrücken, welches Produkt im Bezug auf die Kontrolle höher oder niedriger exprimiert wurde. Vergleiche erfolgen über die Ermittlung dieser relativen Expression nur innerhalb einer Sequenz.

3.4.3.9 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Amplifikate

Die Überprüfung des entstandenen Produkts geschieht nicht nur über die Schmelzkurve, sondern exemplarisch auch durch das Auftragen der Amplifikate in einem Agarosegel. Quellen zu diesem Verfahren finden sich in den Fußnoten.⁹⁴ Ähnlich wie bei der SDS-PAGE wird ein 100bp-Marker neben den Proben in ein Gel pipettiert und über das Anlegen einer Spannung aufgetrennt. DNA-Stränge sind negativ geladen und wandern antiproportional in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich weit Richtung Anode. D.h. je kleiner ein Strang ist, desto weiter läuft er im Gel. Es werden 2%ige Gele aus 100ml 1xTAE (Verdünnung aus 50xTAE) und 2g Agarose angesetzt und erwärmt, in das noch flüssige Gel wurden anschließend 3µl eines Farbstoffs (GelRed) pipettiert, das Gel in ein Plastikgestell mit einem Kamm zur Formung der Taschen gegossen und ca. 30 Minuten auspolymerisiert. Die

⁹⁴ Vgl. *Hayward, G. S. et al.*, The chromosome, 1972, S. 383–395; vgl dazu auch. *Adkins, S. et al.*, Visualization of, 1996, S. 17–23.

Proben in den PCR-Strips werden im Verhältnis 1:10 mit TAE-Auftragspuffer versehen, dann werden je 18µl Marker und Proben in die Taschen pipettiert. Als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer dient 1xTAE; das Gel wird in die Kammer gelegt und an eine 95V Spannung angeschlossen bis die Lauffront ca. 3-4cm ins Gel gelaufen ist. Die Detektion der Banden erfolgt über UV-Licht bei 312nm. Anhand des mitlaufenden Markers können die Größen der PCR-Produkte abgeschätzt werden.



Darst. 3 Elektrophoretische Auftrennung PCR-Produkte FSP1 (161bp)

3.4.4 Magnetische Zellseparierung

Die Separierung von Zellen aufgrund magnetischer Eigenschaften bzw. gelabelter Antikörper/Beads wurde schon relativ früh beschrieben.⁹⁵ Da die Charakterisierung der einzelnen Zellen der Primärkulturen aus dem Herzen ein wichtiger Punkt ist, um der Identifizierung der Progenitorzellen näher zu kommen, wird dieses Verfahren exemplarisch an zwei humanen Zellkulturen zum Zeitpunkt der Trypsinierung, d.h. nach vierwöchiger Kultur, angewendet. Hierzu werden magnetische Kügelchen (Dynabeads®) und die entsprechenden Protokolle der Firma Invitrogen (DSB-X™ Biotin Protein Labeling Kit (D-20655) und Dynabeads® FlowComp™ Flexi) verwendet. Das Verfahren gliedert sich in mehrere Abschnitte: zunächst müssen die gewählten Antikörper (in diesem Falle c-Kit und sca-1) mit einer Biotin ähnlichen Substanz gelabelt, die Zellen mit diesen Antikörpern inkubiert und die Beads auf die

⁹⁵ Vgl. Owen, C. S. et al., Magnetic labeling, 1984, S. 41–48; vgl. dazu auch Miltenyi, S. et al., High gradient, 1990, S. 231–238.

vorhandene Zellmenge abgestimmt werden. Anschließend erfolgt die Inkubation der mit den Antikörpern versehenen Zellen mit den Beads, die magnetische Separierung mit Gewinnung der Positiv- und Negativfraktion und zuletzt das Entfernen der Beads aus der Suspension. Für diese Schritte werden zwei entsprechende Kits der Firma Invitrogen verwendet.

Das Labeln der Antikörper (die keine Proteine/Tris oder Glycin enthalten dürfen) geschieht mit einem Derivat des Desthiobiotin (DSB-X[™] Biotin) in Kombination mit einem Ester, aus dem Grund, weil dieses Derivat reversibel an Streptavidin/Avidin u.a. bindet und so eine Trennung der Beads von den Antikörpern bei Raumtemperatur und neutralem pH ermöglicht.⁹⁶ Es wird das Protokoll zum Labeln geringer Antikörpermengen verwendet. Hierzu wird 1mol/l NaHCO₃ angesetzt und zu 200µl des jeweiligen Ak pipettiert. Das DSB-X Biotin wird mit DMSO gelöst und in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration unter ständigem Rühren zu dieser pipettiert. Währenddessen werden Säulen zur Reinigung des überschüssigen Biotins vorbereitet und die Antikörpersuspension über diese Säulen geschickt. Nach Beenden der Prozedur sollen 80-90% der Antikörper gelabelt sein und können für die weitere Separierung eingesetzt werden. Nicht verwendete Antikörper werden mit BSA versetzt und bei 4°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Die Zellen, die über die gelabelten Antikörper und die Beads separiert werden sollen, werden vorbereitet, indem der konditionierte Überstand abgenommen wird, ggf. 1:100 Verdünnungen für die weiteren Versuche hiervon hergestellt werden und die Schalen zweimal mit 1xPBS und einmal mit EDTA gewaschen werden. Anschließend folgt, wie bereits beschrieben, die Trypsinierung. Um das Trypsin zu inaktivieren werden die Zellen in das Zellkulturmedium nach der Trypsinierung aufgenommen. Außerdem werden die Schalen, in welche die separierten Zellen ausplattiert werden, mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dann folgt die Zellzählung per Neubauer Zählkammer, um die Menge der Beads auf die Zellzahl abstimmen zu können. Desweiteren muss ein Isolierungspuffer aus PBS, 0,1% BSA und 2mM EDTA hergestellt werden, in dem die Zellen in einer Konzentration von 1×10^8 /ml resuspendiert werden. Nach Zugabe der passenden Menge gelabeltem Antikörper folgen Inkubations- und Waschschrte, die Zugabe der Beads, erneute Inkubation und schließlich das Einsetzen der Tubes

⁹⁶ Vgl. *Hofmann, K. et al., Avidin binding, 1982, S. 978–984.*

in den Magneten. Die Beads wandern seitlich an die Wand des Tubes, der verbleibende Überstand ist die Negativfraktion. Die Prozedur wird dreimal wiederholt, im letzten Schritt allerdings wird der „Release Buffer“ hinzugefügt und wiederum zehn Minuten inkubiert. Die Trennung im Magneten sollte in diesem letzten Schritt dann nur die Beads enthalten, die Zellen mit den Antikörpern sind im Überstand, dies ist die Positivfraktion, welche abzentrifugiert und in dem „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ resuspendiert wird. Kultiviert wurden sowohl die Positiv- als auch die Negativfraktion. Selektionsversuche wurden mit c-Kit und sca-1 Antikörpern durchgeführt.

3.4.5 Differenzierung

Wie in der Einleitung erwähnt, ist das Potential zur Differenzierung entscheidend für die Definition von Stamm- und Progenitorzellen. Aus diesem Grunde wird in dieser Studie exemplarisch ein Differenzierungsversuch anhand eines bereits publizierten Protokolls nachvollzogen.⁹⁷ 5-Azacytidin wird unter Berücksichtigung der Herstellerangaben mit dem „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ verdünnt und in einer Konzentration von 5µM eingesetzt, außerdem werden 100µM Ascorbinsäure und 1ng/ml TGF-β verwendet. Die Zellreihe wird bis zum Zeitpunkt der Trypsinierung (vier Wochen nach dem Anlegen) wie bereits beschrieben kultiviert. Für das Differenzierungsprotokoll werden zwölf Schalen des Typs Falcon 353004 und sechs Schalen des Typs Falcon 353001 angelegt. Jeweils die Hälfte wird für das Differenzierungsprotokoll verwendet, die andere Hälfte gilt als Kontrolle. Die kleinen Schalen dienen außerdem der Dokumentation der Zellveränderungen über eine Phalloidininfärbung. Phalloidin ist ein Toxin des Pilzes *Amanita phalloides* und bindet spezifisch an F-Aktin Filamente.⁹⁸ Vier Tage nach der Trypsinierung startet die Differenzierung mit dreimaliger Azacytidinbehandlung, zwei Tagen Pause und ab diesem Zeitpunkt mit regelmäßigen Zugaben von Ascorbinsäure (jeden zweiten Tag) und TGF-β (zweimal wöchentlich). Der Mediumwechsel erfolgt nach wie vor alle zwei Tage. Der Versuch wird über den normalen Erntezeitpunkt hinaus für drei Wochen durchgeführt.

⁹⁷ Vgl. *Smits, A. M. et al.*, Human cardiomyocyte, 2009, S. 232–243.

⁹⁸ Vgl. *Wieland, T.*, Peptides of, 1986.

Nach jeweils einer Woche werden Phalloidininfärbungen der Zellen durchgeführt. Zusätzlich wird eine Kulturschale mit ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte als Positivkontrolle mitgefärbt. Das Protokoll ist das der Firma Biotium. Die Stocklösung Phalloidin wird nach Herstellerangaben mit Ethanol angesetzt. Der konditionierte Überstand der Schalen wird abgenommen und eingefroren, die Schalen selbst dreimal mit gekühlter 1xPBS Lösung gewaschen. Zur Fixierung wird für 15 Minuten 3,75%iges Paraformaldehyd verwendet, wobei die Zellen mit Eis gekühlt werden. Anschließend erfolgt erneutes dreimaliges Waschen mit 1xPBS. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wird Magermilchpulver 3%ig mit 1xPBS angesetzt und bei 4°C für eine Stunde auf die Schalen gegeben. Die Milch wird dekantiert, es folgt ein Waschschrift mit 1xPBS. Anschließend wird die Verdünnung des Phalloidins angesetzt (5µl der Stocklösung auf 200µl 1xPBS mit 1%BSA pro Schale) und die entsprechende Menge für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schalen gegeben. Gegebenenfalls schließt sich nun eine Färbung der Kerne mit Hoe an (vgl. Beschreibung Immunfluoreszenz). Die Schalen werden abschließend direkt oder nach Aufbringen auf einen Objektträger mit Hilfe eines Eindeckmittels (Citifluor, Entellan[®]) mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Keyence betrachtet.

3.4.6 Immunfluoreszenz

Die Methode, mit gelabelten Antikörpern spezifisch einzelne Antigene zu markieren, stammt in ihrem Ursprung von Coons et al.⁹⁹ Wenige Jahre später wurde sie erneut z.B. von Beutner zusammengefasst.¹⁰⁰ Grundsätzlich unterscheidet man die direkte (der Antikörper, der das gesuchte Antigen detektiert ist selbst mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt) von der indirekten Nachweismethode (der primäre Antikörper wird von einem gelabelten sekundären Antikörper erkannt).¹⁰¹ Das Fluoreszenzsignal kann von entsprechenden Mikroskopen detektiert werden. In dieser Studie wurde i.d.R. ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop der Firma Keyence verwendet, dessen Prinzip auf der Aussendung von Anregungslicht und der Detektion des Emissionslichtes durch das Objekt besteht. Exemplarisch wurde mit einem konfokalen Mikroskop (ZEISS) gearbeitet, dessen Funktionsprinzip im Gegensatz zum konventionellen Fluoreszenzmikroskop auf der alleinigen Abbildung der Fokusebene (konfokal) und der Anregung mit Laserlicht besteht. Lichtemissionen

⁹⁹ Vgl. Coons, A. H., Fluorescent antibody, 1958, S. 399–422.

¹⁰⁰ Vgl. Beutner, E. H., Immunofluorescent staining, 1961, S. 49–76.

¹⁰¹ Vgl. Mulisch, M. et al. (Hrsg.), Romeis Mikroskopische, 2010.

außerhalb der Fokusebene werden somit nicht berücksichtigt und es ist möglich, gezielt einzelne Strukturen des Objekts zu betrachten.¹⁰²

Untersucht werden Fibroblasten der Maus, Endothelzellen der Ratte, ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte, sieben humane Herzzellkulturen, HUVECS und die humanen Fibroblasten. Marker sind c-Kit, Vimentin, vWF, Troponin, CD31, sca-1 und FSP1, die als indirekte Immunfluoreszenz mit Cy2, Cy3, Cy5 und FITC gelabelten Sekundärantikörpern detektiert werden. Es werden in Abhängigkeit von der Lokalisation der gesuchten Antigene verschiedene Protokolle verwendet, die am Ende als Modifikationen beschrieben werden. Die Zellen werden nach der Trypsinierung auf runden Glasplättchen (CoverSlip), die zuvor in Ethanol eingelegt und abgeflemt wurden, in Falconschalen des Typs 353001 ausplattiert. Zum Zeitpunkt der Ernte wird der konditionierte Überstand abgenommen und eingefroren. Die Zellen werden mit 1ml 10%iger TCA-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit 1ml 1xPBS plus 0,1-1% Triton für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend eine Stunde mit 5%BSA, angesetzt in 1xPBS, geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgt mit 500µl in der Verdünnung nach Angaben der Hersteller für 90 Minuten. Danach wird er dekantiert und die Schalen dreimal für 10 Minuten mit 1xPBS plus 0,1%Triton gewaschen. Der Zweitantikörper wird entsprechend dem Erstantikörper ausgesucht, nach Herstellerangaben verdünnt und für 30 Minuten unter Lichtausschluss auf die Schalen gegeben. Neben den mit Erst- und Zweitantikörper behandelten Schalen, gibt es pro verwendetem Sekundärantikörper eine Kontrollschale, auf der nur dieser verwendet wird. Um die Kerne der Zellen sichtbar zu machen, folgt eine Färbung mit Hoe (der nach Herstellerangaben angesetzte konzentrierte Farbstoff wird nochmals 1:10 mit a.b. verdünnt). Es werden 20µl dieser Verdünnung für zehn Minuten auf die Schalen gegeben und zuletzt noch einmal mit 1xPBS gewaschen. Die Betrachtung der Zellen erfolgt nun mit Hilfe der passenden Filter des Mikroskops (entscheidend sind die jeweiligen Wellenlängen des Anregungs- und des Emissionslichtes) entweder direkt in der Schale oder unter Verwendung eines nicht selbst fluoreszierenden Eindeckmittels (Citifluor, Entellan®) auf einem Objektträger, wobei die Kontrolle zuerst betrachtet und die hier vorhandene Fluoreszenz über die Belichtungszeit herunterreguliert wird. Mit dieser regulierten Zeit werden im

¹⁰² Vgl. *Mulisch, M. et al. (Hrsg.), Romeis Mikroskopische, 2010.*

Anschluss die anderen Schalen betrachtet, um nur die zusätzlich detektierbaren Signale zu beurteilen. Folgende Modifikationen des Protokolls werden vorgenommen: Oberflächenmarker (CD31, c-Kit) werden ohne Triton behandelt, in exemplarischen Nachweisen wird TCA gegen PFA ausgetauscht und je nach Antikörper statt BSA Milch verwendet.

3.5 Beschreibung der durchgeführten Versuche

3.5.1 Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten des Rattenherzens

Die hier angewandte Methode folgt bereits vorhandenen Beschreibungen¹⁰³ und Weiterentwicklungen.¹⁰⁴ Zur Präparation der ventrikulären Kardiomyozyten werden adulte, männliche Wistarratten im Alter zwischen drei und vier Monaten verwendet. Die Betäubung erfolgt in einem sechs Liter fassenden Exsikkator mit 1,5ml Isofluran; anschließend wird ein Genickbruch herbeigeführt. Die Haut über dem Brustkorb wird großflächig desinfiziert und die Brusthöhle eröffnet. Herz und Lunge werden entnommen, in eine mit 4°C kalter 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllte Schale überführt und freipräpariert. Die nächsten Schritte erfolgen an der Perfusionsanlage nach Langendorff, welche zur Vorbereitung zunächst mit Wasser und anschließend mit Powell-Medium gespült, sodann mit 80ml Powell-Medium luftblasenfrei befüllt und auf 37°C erwärmt wurde. Das Medium wird über die gesamte Zeit der Perfusion mit einem CO₂-Sauerstoff-Gemisch (Carbogen) begast. Das freipräparierte Herz wird am Aortenstumpf über eine Kanüle an die Anlage gehängt, so dass die Perfusion retrograd über die Koronargefäße bzw. den linken Ventrikel in den rechten Vorhof bzw. rechten Ventrikel erfolgen kann. Um das Herz blutfrei zu perfundieren, werden 35ml Powell-Medium mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. einem Tropfen pro Sekunde durch die Aorta geleitet; dieser Schritt erfolgt ohne die Zugabe von Kalzium. Die nun folgende Verdauung umfasst je nach Herzgröße ca. 25 Minuten. Benötigt wird ein zuvor angesetztes Gemisch aus 25mg Kollagenase Typ II und 5ml Powell-Medium, außerdem werden 12,5µl einer Kalziumchloridlösung (100mM) hinzugefügt. Dieses Gemisch wird in die Anlage eingebracht und zirkuliert in einem Gesamtvolumen von 50ml über eine Schlauchpumpe durch das Herz, bis eine Farbveränderung und verminderte Konsistenz des Gewebes festzustellen sind.

¹⁰³ Vgl. Piper, H. M. et al., *Culturing of*, 1982, S. 397–412; vgl. dazu auch Volz, A. et al., *Longevity of*, 1991, S. 161–173; vgl. dazu auch Farmer, B. B. et al., *Isolation of*, 1983, S. 1–18.

¹⁰⁴ Vgl. Schlüter, K.-D. et al., *Adult ventricular*, 2005, S. 305–314.

Das verdaute Herzgewebe wird über den Ventrikeln abgesetzt und zunächst manuell in einem Uhrenglas und anschließend mit einem TissueChopper (Schnittbreite 0,7mm) weiter zerkleinert. Der so erhaltene Zellbrei wird in 12ml der oben beschriebenen Kollagenaselösung für fünf Minuten unter Auf- und Abpipettieren nachverdaut und anschließend über eine Nylongaze (Porengröße 200µm) filtriert. Das Filtrat wird bei 400rpm für drei Minuten zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet mit 6ml Powell-Medium und 12,5µl Kalziumchlorid (100mmol/l) resuspendiert. Der aus diesem Schritt resultierende Überstand enthält nichtmyokardiale Zellen (z.B. Endothelzellen), die bei 2000rpm für fünf Minuten zentrifugiert werden, um ein Zellpellet zu erhalten, welches entweder kultiviert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren wird. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt des resuspendierten kardiomyozytenhaltigen Pellets wird dieses zweite Zellpellet mit 6ml Powell-Medium, in dem sich 25µl Kalziumchlorid (100mmol/l) befinden, versetzt, aufgeschüttelt, die Suspension auf zwei Röhrchen, die mit je 6ml Powell-Medium und 60µl Kalziumchlorid (100mmol/l) befüllt sind, gleichmäßig verteilt und eine Minute mit 300rpm zentrifugiert. Die durch diesen Schritt gewonnenen Zellpellets enthalten die für die Versuche einsetzbaren stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

3.5.2 Kultivierung isolierter Kardiomyozyten

Die Kultivierung erstreckt sich mit der Vorbereitung der Schalen und der Stimulation der Zellen über drei Tage. An Tag eins werden Kulturschalen vom Typ 353001 unter der Sterilbank mit 1,5ml Vorplattiermedium beschichtet und bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit über Nacht im Brutschrank gelagert. Das Vorplattiermedium enthält 4% FCS, welches dazu dient, die ventrikulären Kardiomyozyten anheften zu lassen. Das Ausplattieren der Kardiomyozyten erfolgt am darauffolgenden Tag unmittelbar nach Gewinnung der Zellpellets und nachdem das Vorplattiermedium kurz vorher von den Schalen abgesaugt worden ist. Hierzu werden jeweils 5ml des Ausplattiermediums, welches im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, zum Resuspendieren der Zellpellets in die Reagenzröhrchen gefüllt und vorsichtig auf und ab pipettiert, so dass sich die Zellen gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilen. Die Suspensionen beider Röhrchen werden zusammenpipettiert, geschwenkt und anschließend auf die vorbereiteten Schalen verteilt (1ml pro Schale). Die Anzahl bzw. Konzentration der ausplattierten Zellen ist hierbei abhängig von der gewonnenen Zellzahl während der Präparation; Ziel sind funktionsfähige kalziumtolerante

stäbchenförmige Kardiomyozyten. Das Ausplattieren erfolgt mit auf den Schalenboden aufgesetzter Pipette, um unnötige Krafteinwirkungen auf die Zellen zu vermeiden. Die Schalen werden für eineinhalb Stunden zurück in den Brutschrank gestellt, damit sich die ventrikulären Kardiomyozyten anheften können. In dieser Zeit werden die verdünnten und standardisierten Proben zur Stimulierung der Kardiomyozyten vorbereitet (siehe Kapitel 3.4.3). Nicht angeheftete bzw. abgestorbene runde Kardiomyozyten werden nach dieser Inkubation durch zweimaliges Austauschen des Ausplattiermediums mit je 1ml Waschmedium entfernt, die in der Schale verbliebenen stäbchenförmigen Kardiomyozyten sind die Versuchszellen, die im nachfolgenden Schritt stimuliert und für 24 Stunden erneut bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit bis zu ihrer Messung am dritten Tag inkubiert werden.

3.5.3 Inkubation der Kardiomyozyten mit standardisierten Proben

Aus den bei der Zellernte (also nach sechs Wochen Kultivierung) gewonnenen konditionierten Überständen der angelegten Zellkulturen, den zusätzlich unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen und dem verwendeten Medium (= „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“) als Kontrolle werden Aliquots von 10µl entnommen und mit sterilem a.b. 1:100 verdünnt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung werden sowohl die Überstände als auch die Verdünnungen bei -20°C eingefroren. Es wird darauf geachtet, dass Überstände und Verdünnungen für die Messungen der Zellverkürzung maximal einen Auftauprozess durchlaufen, um möglichen Proteinschaden so gering wie möglich zu halten. Zu Beginn der Versuchsreihe werden von diesen Verdünnungen je Versuchsbedingung 10µl auf jede Schale pipettiert, im weiteren Verlauf der Versuchsreihe werden die Verdünnungen über ihren Totalproteingehalt anhand eines Kits (Pierce® BCA Protein Assay Kit) standardisiert. Das entsprechende Protokoll, verwendet wird das Verdünnungsschema für Proteinkonzentrationen zwischen 5-250µg/ml, basiert auf der Biuretprobe, bei der Proteine mit Kupfer unter Anwesenheit von BCA Farbkomplexe eingehen, die anhand eines violetten Umschlags der pipettierten Lösungen sichtbar werden.¹⁰⁵ Je dunkler der Farbumschlag ist, desto höher ist die Proteinkonzentration. Die Konzentrationen der zu untersuchenden Verdünnungen werden vergleichend zu einem Standardprotein (BSA), welches in definierten

¹⁰⁵ Vgl. Lowry, O. H. et al., Protein measurement, 1951, S. 265–275; vgl. dazu auch Smith, P. et al., Measurement of, 1985, S. 76–85.

Konzentrationen von 250µg/ml über 125µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 5µg/ml und 0µg/ml angesetzt wird, in einem Microplate-Reader bei 562nm gemessen. Hierzu werden 100µl jeder Verdünnung und jeder Standardproteinkonzentration in Tubes pipettiert, mit 2ml so genanntem Working Reagent (Teil des Kits) versehen und für 30 Minuten bei 60°C in einem Wasserbad bzw. Thermoblock erhitzt. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur werden sie über den Reader ausgelesen (Absorptionsmessungen bei 562nm). Die ermittelten Absorptionswerte werden in eine Exceltabelle übertragen und über die Geradengleichung der Standardkurve in Konzentrationen umgerechnet. Berechnet wird anschließend das benötigte Volumen je Verdünnung, um 1µg Protein pro Kardiomyozytenschale zu verwenden. Entsprechend diesen Berechnungen werden die Verdünnungen nach den Waschschritten auf die mit 1ml Medium gefüllten Schalen pipettiert und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.5.4 Messung der relativen Zellverkürzung im elektrischen Feld

Die nach der in Punkt 3.4.1 erläuterten Methodik gewonnenen ventrikulären Kardiomyozyten werden zur Überprüfung verschiedener Funktionsparameter (hier interessiert insbesondere die relative Zellverkürzung) eingesetzt. Es werden nicht stimulierte Kardiomyozyten (= Kontrolle) mit solchen verglichen, die eine 24stündige Stimulation mit den oben beschriebenen Verdünnungen konditionierter Überstände bzw. mit dem „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ erfahren haben.

Beschrieben wurde eine dem Sensor der Zeilenkamera zu Grunde liegende Technik 1969 und das Verfahren der Zellverkürzungsmessung 1989¹⁰⁶ bzw. aktueller 2003¹⁰⁷. Die isolierten Kardiomyozyten befinden sich in einer Schale mit Waschmedium, welche in eine Vertiefung des Objektisches eines inversen Mikroskops gestellt und mit einem Deckel, in dem zwei Drähte rechtwinklig angeordnet und mit einem Stimulator verbunden sind, geschlossen wird. Die Drähte fungieren als Kathode bzw. Anode; zwischen ihnen besteht ein Stromfluss (bzw. ein elektrisches Feld), der sich auf die Myozyten überträgt. Über einen Stimulator wird nun eine Rechteckspannung (20V, 5 Millisekunden) erzeugt, d.h. eine Spannung, die vom Nullpunkt sofort in die positiven bzw. negativen Maximalwerte springt und somit im Gegensatz zu einer

¹⁰⁶ Vgl. Piper, H. M et al., The negative, 1989, S. 333–337; vgl dazu auch Smith, G., Willard Boyle, 2011, S.37

¹⁰⁷ Vgl. Langer, M., Mechanism of, 2003, S. 289-297.

üblichen Wechselspannung mit Sinuskurvenverlauf keinen kontinuierlichen sondern einen sprunghaften biphasischen Stromfluss zur Folge hat, ähnlich einem „An- und Abschalten“. Dieser biphasische Strom besitzt eine definierbare Frequenz (in diesem Falle 0,5 Hz) und führt zu festgesetzten Stromimpulsen, die über den Deckel der Schale und die Drähte auf die Myozyten übertragen werden. Die Zellen verkürzen sich somit in der gleichen Frequenz, in der die Rechteckspannung erzeugt wird. Zellen, die sich nicht in diesem aufgezwungenen Rhythmus bewegen, werden für den Versuch nicht berücksichtigt.

Um die Bewegung der Myozyten detektieren zu können, bedarf es einer Kamera mit hoher örtlicher Auflösung und schneller Auslesung des Sensors. Aus diesem Grunde wird zur Übertragung des Zellbildes eine Zeilenkamera verwendet. Treffen Photonen des betrachteten parallel zur Zeile ausgerichteten Objekts (in diesem Fall die sich verkürzenden Myozyten und ihre unmittelbare Umgebung) auf den lichtempfindlichen in einer Zeile angebrachten Sensor der Kamera, werden sie über Elektronen in eine Spannung umgesetzt und über ein Interface von einem Oszillograph (Horizontalverstärker 0,1ms/cm, Vertikalverstärker 5V/div) ausgelesen. „Hell“ bedeutet also Spannungssignal und vertikaler Ausschlag entlang der y-Achse. „Dunkel“ bedeutet kein Spannungssignal, kein Ausschlag, bzw. kontinuierliche Linie im Bild des Oszillographen. Die Zellgrenzen bilden die Übergänge von hell zu dunkel bzw. dunkel zu hell; sie werden als Amplituden im Oszillographenbildschirm angezeigt und verschieben sich über die Zeit (x-Achse) entsprechend der angelegten Stromimpulsfrequenz. Neben dem so erhaltenen Spannungsbild wird gleichzeitig über eine zweite normale Kamera ein Bild der Schale mit den Myozyten und der Kamerazeile auf einen Monitor übertragen, so dass es möglich ist, die gewünschte Zelle parallel zu der Kamerazeile mit dem Sensor auszurichten und die Zellgrenzen über die Zeilenkamera zu bestimmen. Um die einzelnen Parameter der Zellverkürzung berechnen zu können, muss das Spannungsbild ausgemessen und über eine Software an einem Computer ausgewertet werden. Dies geschieht über eine kontinuierliche Spannung des Interface selbst, angelegt an einem zweiten Kanal. Die Auslesung dieser zweiten Spannung beginnt, wenn die Amplitude der ersten Zellgrenze des Zellbildes eine erste Triggermarke übersteigt bzw. endet, wenn die Amplitude der zweiten Zellgrenze des Zellbildes erreicht wird. Die Triggermarken sind manuell von der messenden Person vor die Amplitude des Zellbildes zu setzen.

Die so ermittelten Spannungssignale werden grafisch in eine Kurve Zellverkürzung (in μm) über die Zeit (in ms) umgesetzt. Der Zeitpunkt der Übermittlung und Aufzeichnung der Spannungsdaten des zweiten Kanals wird manuell in dem Softwareprogramm über einen Mausklick ausgelöst. Es werden i.d.R. Kardiomyozyten eines Herzens für 24 Schalen (vgl. Darstellung in den Ergebnissen) verwendet. Pro Schale werden 8-10 Zellen eingestellt und pro Zelle vier Messungen durchgeführt.

3.5.5 Bestimmung der Zellverkürzungsparameter und statistische Auswertung

Die soeben beschriebenen Messungen liefern Daten über folgende Funktionsparameter, die in Excel übertragen und mit SPSS bzw. STATISTICA ausgewertet werden: Die diastolische Länge (LDiast) der jeweils gemessenen Kardiomyozyte in Mikrometer, die Zeit von Beginn der Zellverkürzung bis zu ihrer maximalen Verkürzung (Time to peak, TTP) in Millisekunden, das maximale Maß der Verkürzung der Zelle (Amplitude) in Mikrometern (wird dieser Wert von der diastolischen Länge subtrahiert, ergibt sich die systolische Zelllänge), die Zeit bis die Zelle um 50% verkürzt ist (TTP50%) in Millisekunden, die Zeit, die von der maximalen Zellverkürzung bis zur Relaxation auf 50% der Zellverkürzungsstrecke (R50%) vergeht, in Millisekunden, die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde. Weiterhin werden hieraus die mittlere Verkürzungsgeschwindigkeit (Mean shortening) berechnet, d.h. die durchschnittliche Geschwindigkeit, mit der sich die Zelle von der diastolischen Zelllänge bis zur maximalen Zellverkürzung bewegt (dies ist ungleich der maximalen Zellverkürzungsgeschwindigkeit; vielmehr ist es die Ermittlung der Zellverkürzungsgeschwindigkeit anhand der gemessenen maximalen Verkürzung (Amplitude) in Mikrometern und der Zeit, die bis eben dahin vergeht in Millisekunden auf die Geschwindigkeit pro Sekunde hochgerechnet). Für diese Studie interessiert insbesondere das Verhältnis der Amplitude zur diastolischen Zelllänge in Prozent. Dies ist die relative Zellverkürzung (die Verkürzung der Zelle normiert auf ihre diastolische Länge), die hauptsächlich als Funktionsparameter zur Charakterisierung des Einflusses der konditionierten Überstände auf die Funktion der ventrikulären Kardiomyozyten herangezogen wird. Von den vier Messungen aller Parameter pro Zelle und letztlich auch von allen gemessenen Zellen werden der Median, der

Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes bestimmt. Die Analyse der Daten erfolgt u.a. über den Test auf Normalverteilung, Varianzanalyse (ANOVA) mit post hoc-Test und T-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Vgl. hierzu auch das Kapitel Statistik.

3.5.6 Induktion einer Hypoxie durch Veränderungen des Umgebungsmilieus

Zur Untersuchung einer Minderversorgung mit Sauerstoff, wie sie *in vivo* z.B. bei einem Herzinfarkt im Zuge einer KHK auftritt, werden die aus dem Herzen kultivierten Zellen verschiedenen Hypoxiebedingungen ausgesetzt. Insgesamt werden 17 Versuche mit Zellen aus den humanen Primärkulturen, zwei Fibroblastenkulturen der Maus, eine Endothelzellkultur, eine Primärkultur des Herzens der Ratte, eine Kultur humaner Fibroblasten der Lungengefäße und eine humane Endothelzellkultur (HUVEC) unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt.

In einem ersten Versuchsaufbau werden die Zellkulturen am Ende ihrer sechswöchigen Kultivierungsphase direkt nach dem letzten Medienwechsel für 68h in den Versuch genommen: hierbei werden drei Schalen für vier Stunden (4h-Gruppe) und weitere drei Schalen für acht Stunden (8h-Gruppe) unter hypoxische und vier Schalen unter normoxische Bedingungen gesetzt, wobei normoxische Bedingung bedeutet, dass die Schalen nach dem Medienwechsel wieder in den Brutschrank bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert werden. Die übrigen sechs Schalen werden in eine Inkubationskammer (modular incubator chamber) der Firma billups-rothenberg platziert, luftdicht verschlossen und über ein zuleitendes Schlauchsystem für zehn Minuten mit einem N₂/CO₂ Gasgemisch (95%/5%) begast. Anschließend werden die Schläuche für fünf Minuten ohne Gaszuleitung luftdicht verschlossen, so dass sich das Gasgemisch in der gesamten Kammer verteilen kann. Um sicherzustellen, dass das komplette Kammervolumen gefüllt wurde, werden die Schläuche noch einmal geöffnet und eine erneute Gaseinleitung für zwei bis drei Minuten durchgeführt, bevor die Schläuche wiederum abgeklemmt werden. Die Kammer wird nach dieser Prozedur für vier Stunden bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der vier Stunden wird die Kammer geöffnet und die ersten drei Schalen (4h-Gruppe) herausgenommen, während die 8h-Gruppe für weitere vier Stunden nach dem gleichen Verfahren wie oben geschildert begast und zurück in den Brutschrank gestellt wird. Die 4h-Gruppe wird reoxygeniert, indem sie

zu den normoxen Kontrollen zurückgestellt wird und dort bis zum Ende des Versuchs verbleibt. Nach Ablauf der vier Stunden geschieht Gleiches mit der 8h-Gruppe. Daraus ergibt sich folgendes Zeitschema: die normoxischen Schalen werden insgesamt 68 Stunden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, die 4h-Gruppe wird einer vierstündigen Hypoxie mit anschließender 64 Stunden dauernden Reoxygenierung, die 8h-Gruppe einer achtstündigen Hypoxie mit anschließender 60 Stunden dauernden Reoxygenierung unterzogen. Nach Versuchsende werden die Überstände abgenommen, 1:100 Verdünnungen mit 10µl des Überstandes und 990µl a.b. hergestellt, aliquotiert und bei -20°C bis zur Messung der Zellverkürzung eingefroren. Die Zellen werden anschließend für die Aufarbeitung in der PCR geerntet.

Im zweiten Versuchsaufbau wird die Hypoxie nicht mehr durch die Zuleitung eines Gasgemisches hergestellt, sondern über die chemische Umsetzung des Luftsauerstoffs in der Inkubationskammer selbst. Dies geschieht über Gasentwicklungssäckchen, die auf das Volumen der Kammer (BD GasPak-EZ Behältersysteme) abgestimmt sind, so dass ein Wechsel der Inkubationskammern notwendig wird. Die Säckchen enthalten ein Pulver aus anorganischen Karbonaten, Aktivkohle, Ascorbinsäure und Wasser. Sie werden über den Kontakt mit dem Sauerstoff der Umgebungsluft aktiviert und beginnen mit einer spürbaren Wärmeentwicklung. Die aktivierten Säckchen werden zusammen mit den Schalen und einem Indikator in die Kammer gestellt, diese fest verschlossen und nachdem ein deutlicher Innenbeschlag festgestellt wird in einem Brutschrank bei 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C für vier Stunden inkubiert; eine 8h-Gruppe wird in diesem Versuchsansatz nicht durchgeführt. Die anorganischen Karbonate produzieren CO₂, der Sauerstoff in der Kammer wird reduziert. Laut Herstellerangaben wird innerhalb von zwei Stunden eine mikroaerophile Atmosphäre mit 6-16% Sauerstoff und nach zweieinhalb Stunden eine anaerobe Atmosphäre erzeugt, die im Laufe von 24 Stunden >15% CO₂ enthält. Der Indikator sollte nach zwei bis vier Stunden von blau nach weiß umgeschlagen sein, um eben diese Bedingungen anzuzeigen. Das weitere Vorgehen entspricht dem des ersten Versuchsansatzes.

In einer dritten Variation wird grundsätzlich nach dem gleichen Prinzip verfahren wie im zweiten Versuchsansatz, allerdings wird die Dauer der Hypoxie auf insgesamt

sechseinhalb Stunden erhöht, um eine effektive Hypoxiezeit, abzüglich der Dauer der chemischen Reaktion, von vier Stunden zu erreichen.

Die Überstände aus diesen Versuchen (also die jeweiligen 4h- bzw. 8h-Gruppen plus normoxische Kontrollen) werden nach ihrer 1:100 Verdünnung zur Messung der Zellverkürzung ventrikulärer Kardiomyozyten verwendet. Dabei werden eine Kontrollgruppe ohne Behandlung, eine Kontrollgruppe mit Medium, eine 4h-Gruppe und ggf. eine 8h-Gruppe aus einer möglichst gleichen Anzahl an Schälchen gebildet. Außerdem werden die konditionierten Überstände mit Hilfe eines Arrays (RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array I) qualitativ und semiquantitativ auf ihren Zytokingehalt hin untersucht, die Zellen selbst werden entweder für die Aufarbeitung im Western Blot oder in der PCR geerntet.

3.5.7 Zytokinarray

Zur Detektion von verschiedenen Zytokinen aus den konditionierten Überständen wird ein Antikörper-Antigen-Membransystem der Firma RayBiotech verwendet, die geschilderten Informationen zu diesem Array beruhen auf Auskünften der Firma (Beispielreferenz zum Verfahren in den Fußnoten).¹⁰⁸ Das System ermöglicht den Nachweis von 507 verschiedenen Proteinen, darunter Zytokine, lösliche Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle. Das Prinzip des Arrays beruht auf einer verstärkten Chemilumineszenzdetektion über HRP-gelabeltes Streptavidin, welches an die zuvor biotinylierten Proben bindet. Die Proben werden von Antikörpern detektiert, die in Doppelbestimmung in kleinen Spots auf eine Membran aufgebracht wurden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um monoklonale Antikörper z.B. aus der Ratte oder der Maus. Jeweils sechs Spots der Membran an der oberen und unteren linken Ecke sind mit Antikörpern beladen, die sich gegen Streptavidin und HRP richten, sie dienen als Positivkontrollen der Überprüfung des Detektionsprozesses. Die Positivkontrollen sind entweder von Negativkontrollen oder von „blank“-Spots umgeben. „Negativkontrolle“ heißt, dass auf diesen Spots der Puffer aufgetragen ist, in dem die Antikörper gelagert wurden. „Blank“ bedeutet, dass dieser Punkt leer ist. Zusätzlich liegen interne Kontrollen auf der Membran: diese detektieren kein Probenprotein, sondern ein Bakterienprotein, welches den Proben vor der Inkubation der Membranen zugegeben wird. Auf diese Weise wird der Biotinylierungsschritt

¹⁰⁸ Vgl. Lin, Y. et al., Profiling of, 2003, S. 1750–1757.

überprüft, da den Proben eine bekannte Menge Protein zugegeben wird, welches über die adäquate Menge Biotin mit diesem verbunden wird.

Untersucht werden die konditionierten Überstände von Normoxie und Hypoxie zweier humaner kardialer Zellreihen, einer Kultur humaner Fibroblasten und einer Kultur humaner Endothelzellen. Als Kontrolle wird reines „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ des Medienwechsels vor der Ernte verwendet. Die Durchführung des Zytokinarrays erfolgt entsprechend dem mitgelieferten Protokoll des Arrays. Im ersten Schritt werden jeweils 2-3ml jeder Probe in zweimal zwei Litern 1xPBS für drei Stunden dialysiert, um überschüssige Salze zu entfernen. Ist dies geschehen, werden 40µl der internen Kontrolle zu jeder Probe pipettiert und anschließend der Totalproteingehalt jeder Probe über eine spektrophotometrische Bestimmung (NanoDrop®) bei 280nm (Ultraviolettstrahlung) bestimmt. Dies ist notwendig, um eine auf den Proteingehalt abgestimmte Menge an Biotin (7,2µl/1mg Protein) zu den Proben pipettieren zu können. Die Proben werden gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; anschließend wird nicht gebundenes Biotin über die mitgelieferten und (vor Beladung mit der biotinylierten Probe) gewaschenen Säulen entfernt. Dies geschieht über einen Zentrifugationsschritt bei 1000g für drei Minuten. Während der Probenvorbereitung werden die Membranen mit 8ml Blocking Buffer für eine Stunde geblockt. Ist dies beendet, erfolgt die Verdünnung der gereinigten biotinylierten Proben, abweichend vom Protokoll, mit 6ml Blocking Buffer, d.h. in einem Verhältnis von 1:4 (Protokoll: 1:5) und die Inkubation je einer geblockten Membran mit einer Probe für zwei Stunden oder über Nacht. Der letzte Schritt vor der Detektion beinhaltet die Bindung des Biotins an HRP-Streptavidin. Hierzu werden die Proben von den Membranen dekantiert, selbige mit Waschpuffer I und II jeweils dreimal gewaschen und mit 8ml des 500fach verdünnten HRP-Streptavidin für zwei Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die Detektion erfolgt in einem Chemilumineszenzsystem (Software ChemiDoc XRS) nachdem die Membranen mit Detection Buffer für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Es wird alle 20 Sekunden ein Bild gemacht, solange, bis die Proben überstrahlen und optisch keine Änderung in den Intensitäten der abgebildeten Spots mehr zu erkennen ist. Die Bilder werden über das Softwareprogramm QuantityOne geöffnet und die Intensitäten als Adjusted Volume ($\text{INT} \cdot \text{mm}^2$) mit lokal abgezogenem Hintergrund über eine Auswertungsmaske bestimmt. Es wird die Version der aufgenommenen

Bilder verwendet, die keine Überstrahlung mehr erkennen lässt. Die weitere Auswertung erfolgt mit Excel analog zur Auswertungssoftware der Firma RayBiotech: Die gemessenen Intensitätswerte eines Bezugssystems (d.h. Kontrolle, Normoxie, 4h-Gruppe) werden den jeweiligen Antikörpern zugeordnet, der Hintergrund wird über alle Negativ- und Blankwerte, die den Positivkontrollen nicht benachbart sind, bestimmt und von den Einzelwerten für jedes Zytokin abgezogen. Die Positivkontrolle des Mediums wird als Referenz definiert und alle Zytokinwerte der Normoxie und der 4h-Gruppe jeweils auf diese Positivkontrolle bezogen, um Unterschiede in der Belichtungszeit zu normieren. Auf diese Weise können relative Intensitätsunterschiede innerhalb eines Antigen-Antikörpersystems zwischen den einzelnen Gruppen ausgedrückt werden. Bei einer Erhöhung des Wertes der relativen Expression einer Probe gegenüber der Kontrolle um den Faktor 2 bzw. bei einer Erniedrigung des Wertes auf das 0,5fache der Kontrolle wird das jeweilige Zytokin aufgeführt. Die Werte sind so gewählt, dass Unterschiede im Proteingehalt der Proben kompensiert werden sollten.

3.6 Statistik

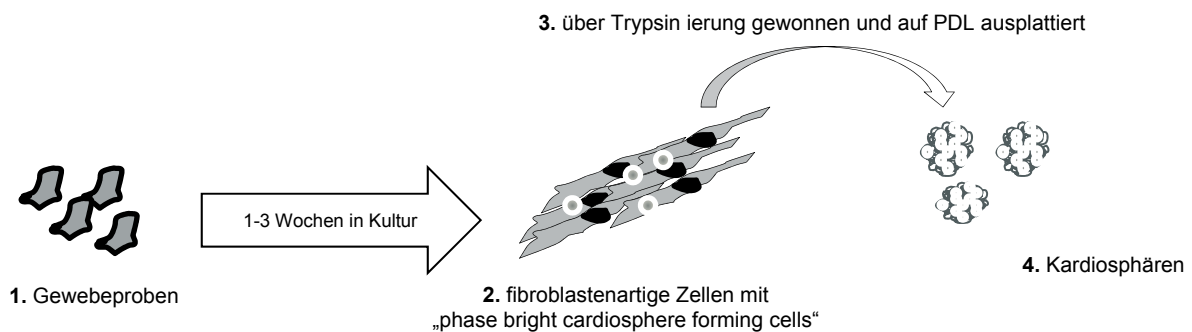
Die erhobenen Daten werden über Mittelwert, Median, Standardabweichung und SEM charakterisiert. Die Darstellung erfolgt, wenn nicht anders genannt, als Box-Whisker-Plot (Median, minimaler und maximaler Wert). Auf Normalverteilung wird durch grafische Darstellung und über den Shapiro-Wilks-Test geprüft. Bei Verletzung der Normalverteilung erfolgen Tests wie z.B. der Test nach Kruskal-Wallis bzw. Mann-Whitney. Desweiteren werden verschiedene Formen der ANOVA oder des t-Tests als Signifikanztests durchgeführt, der Test auf Homogenität der Varianzen ist der Levene-Test. Als post-hoc-Prüfverfahren wird z.B. die Student-Newman-Keuls-Prozedur verwendet. Das Signifikanzniveau wird mit $p < 0,05$ festgelegt, $p < 0,01$ wird als hochsignifikant bezeichnet, signifikante Ergebnisse werden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Verwendete Statistikprogramme sind SPSS und STATISTICA.

4. Ergebnisse

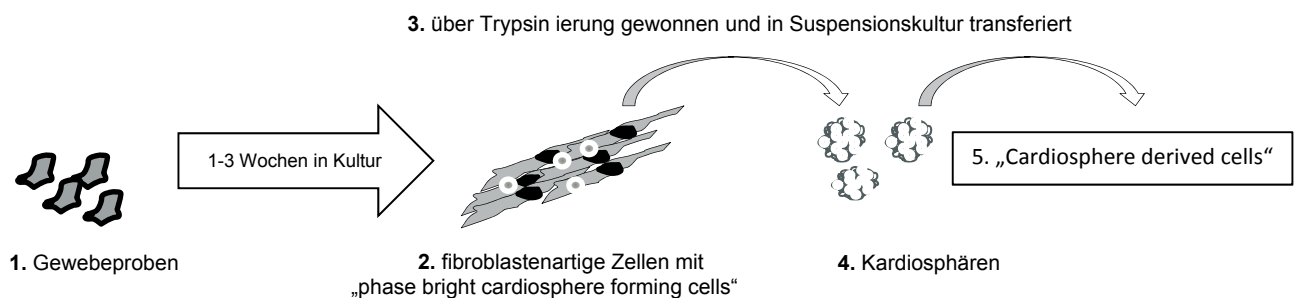
4.1 Kultivierungsverfahren und Morphologie der kultivierten Zellen

CFC/CDC

Das in dieser Studie durchgeführte Kultivierungsverfahren folgt in seinen Grundzügen den Publikationen von Messina et al.¹⁰⁹ bzw. Barile et al.¹¹⁰. Ebenso erfolgt die Nomenklatur in Anlehnung an diese Veröffentlichungen. Die nachfolgende Graphik dient der Veranschaulichung der Prozesse während der Kultivierung, interpretiert anhand der Beschreibung aus ebendiesen Protokollen.



Darst. 4 Prozesse während der Kultivierung nach Messina et al.

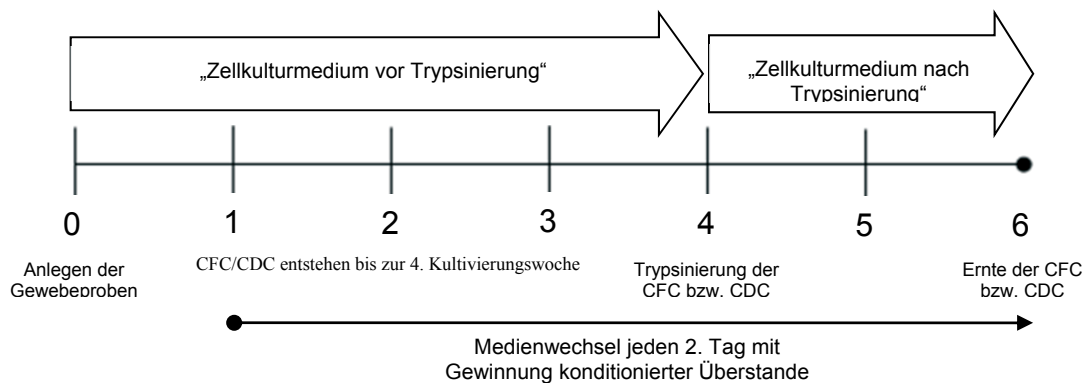


Darst. 5 Prozesse während der Kultivierung nach Barile et al.

¹⁰⁹ Vgl. Messina, E. et al., Isolation and, 2004, S. 911–921.

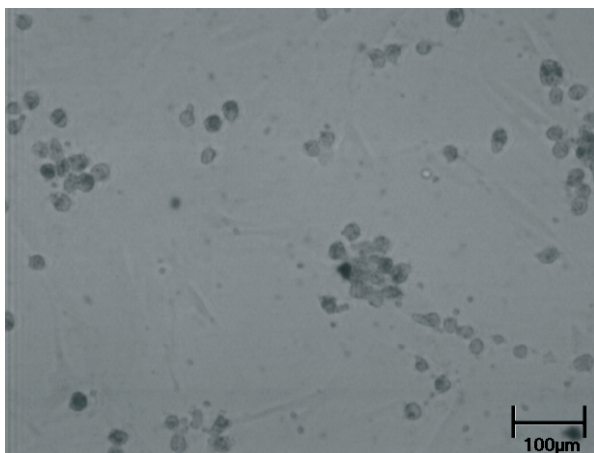
¹¹⁰ Vgl. Barile, L. et al., Endogenous cardiac, 2007, S. 31–48.

Abweichend von obigen Schilderungen wird in dieser Studie nach folgendem Schema verfahren:

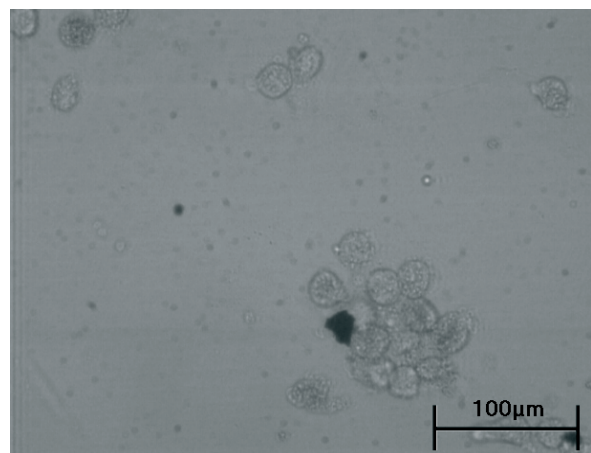


Darst. 6 Übersicht zum zeitlichen Verlauf der Kultivierung in Wochen

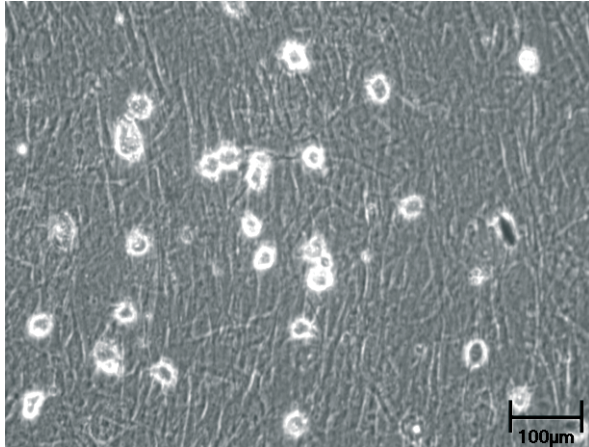
Die humanen Gewebeproben aus dem Herz werden zum einen über einen TissueChopper zerteilt, zum anderen mit Hilfe von Skalpellern zerkleinert und über eine Antrocknungszeit auf dem Schalenboden zum Anheften gebracht. Die Kulturen werden über die gesamte Kultivierungszeit beobachtet und abfotografiert; es zeigen sich bis zum Zeitpunkt der Trypsinierung verschiedene Morphologien: In den ersten Tagen beobachtet man in verschiedenen Zellreihen runde Zellen, mit einem hohen Kern-/Zytoplasmaverhältnis, die direkt aus den Gewebestücken herauswachsen (Darst. 7 und 8). Parallel entwickeln sich fibroblastenartige Zellen, über welchen hellleuchtende runde Zellen sichtbar werden (Darst. 9 u. 10), wie sie in den Veröffentlichungen von Messina und Barile als „phase bright“ erwähnt werden.



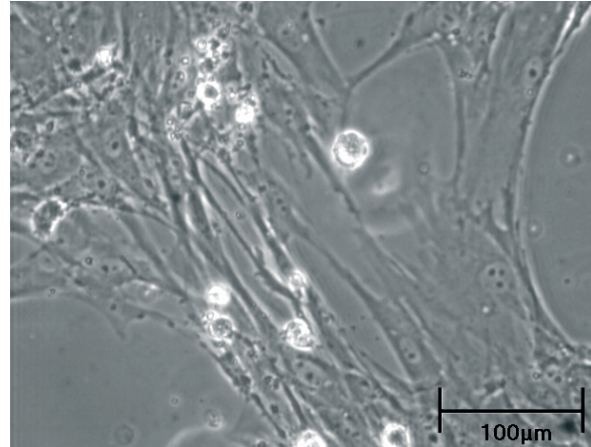
Darst. 7 Runde Zellen mit hohem Kern-/Zytoplasmaverhältnis, 14 Tage nach Anlegen (Objektivvergrößerung 10x)



Darst. 8 Gleiche Lokalisation wie Darst. 7 (Objektivvergrößerung 20x)

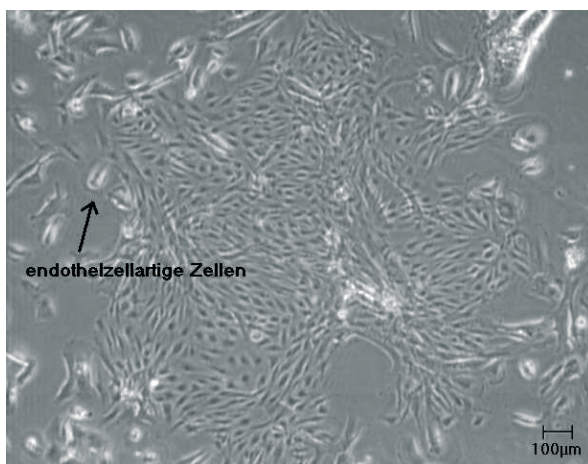


Darst. 9 Primärkultur 23 Tage nach Anlegen, hell leuchtende Zellen (CFC)
(Objektivvergrößerung 10x)

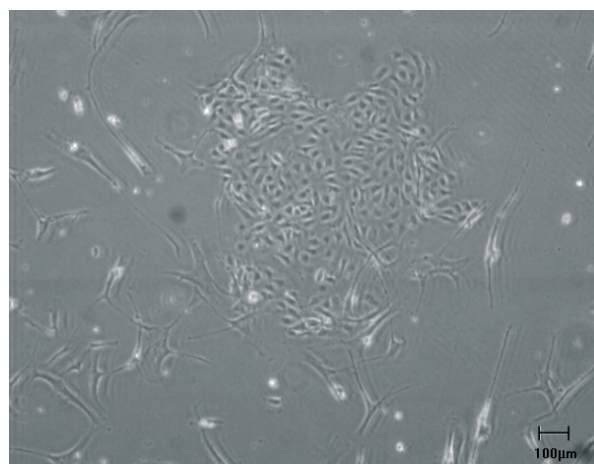


Darst. 10 Fibroblastenartige und hell leuchtende Zellen vier Tage nach Trypsinierung (CFC und CDC) (Objektivvergrößerung 20x)

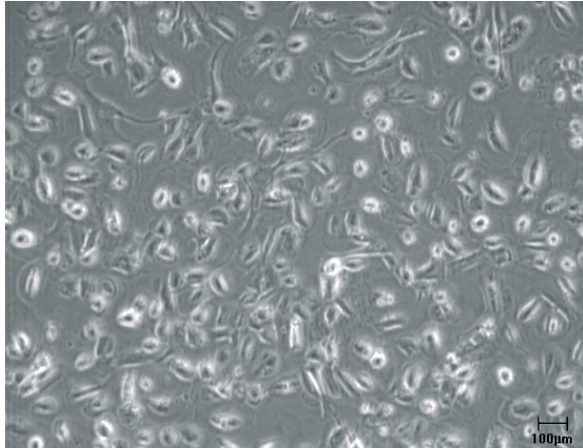
Diese und die fibroblastenartigen Zellen sind sowohl vor als auch nach Trypsinierung zu sehen, mikroskopisch lassen sich keine Änderungen ihrer Morphologie feststellen. In einigen Zellreihen entwickeln sich neben den fibroblastenartigen Zellen in ihrer Morphologie und Lokalisation auf der Schale deutlich abzugrenzende rundliche Zellen mit einem prominenten Kern und einem hell leuchtenden Randsaum. Ordnen sich diese Zellen an, kann eine Art Kopfsteinpflastermuster entstehen, ähnlich dem von Endothelzellen, weshalb diese Zellen als „endothelzellartig“ angesprochen werden (Darst. 11 und 12ff.) Kopfsteinpflastermuster finden sich vor und nach der Trypsinierung als inselförmige Anordnungen verschiedenen Durchmessers.



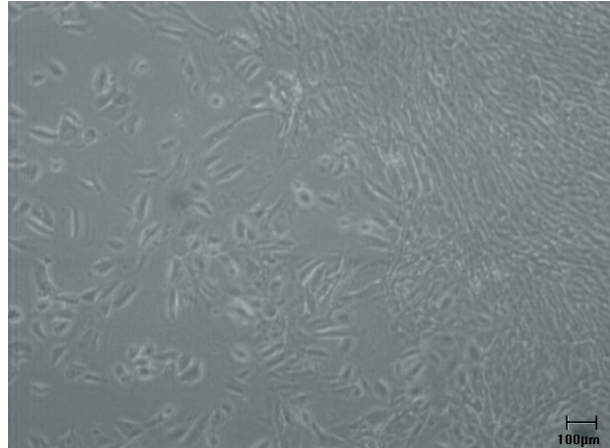
Darst. 11 Primärkultur 27 Tage nach Anlegen, endothelzellartige Zellen im Kopfsteinpflastermuster
(Objektivvergrößerung 4x)



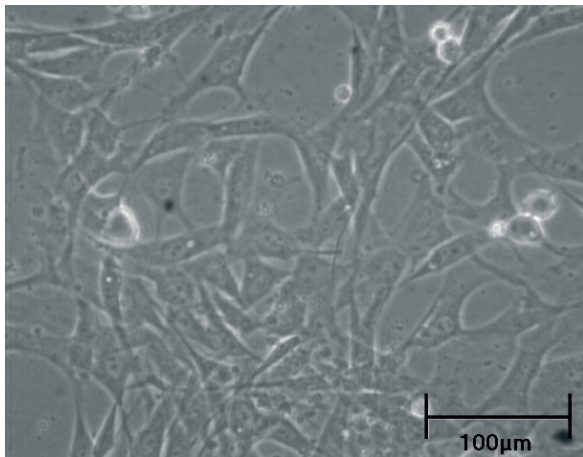
Darst. 12 Zelllinie sechs Tage nach Trypsinierung, Kopfsteinpflastermuster
(Objektivvergrößerung 4x)



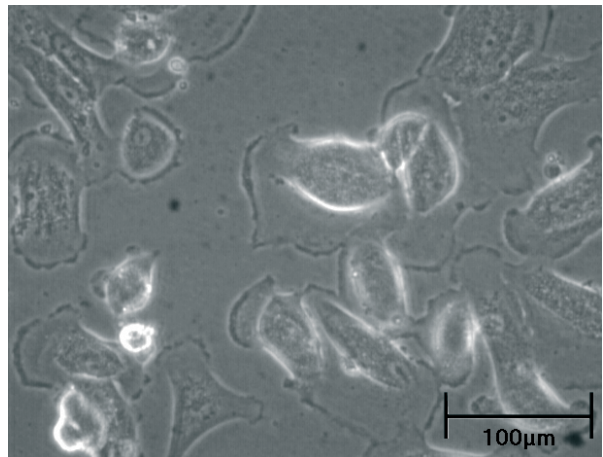
Darst. 13 Primärkultur 29 Tage nach Anlegen, endothelzellartige Zellen
(Objektivvergrößerung 4x)



Darst. 14 Primärkultur 29 Tage nach Anlegen, Grenze zwischen Arealen mit fibroblastenartigen Zellen und endothelzellartigen Zellen
(Objektivvergrößerung 4x)



Darst. 15 Dieselbe Primärkultur wie in Darst.14; 27 Tage nach Anlegen, Areal mit fibroblastenartigen Zellen
(Objektivvergrößerung 20x)



Darst. 16 Dieselbe Primärkultur wie in Darst.14 und 15, 27 Tage nach Anlegen, Areal endothelzellartiger Zellen
(Objektivvergrößerung 20x)

Kardiosphären bilden sich vor und nach der Trypsinierung (Darst. 18 ff.), sowohl in den Arealen mit den fibroblastenartigen als auch den endothelzellartigen Zellen. Der früheste dokumentierte Zeitpunkt für das Auftreten der Kardiosphären liegt bei 14 Tagen nach dem Anlegen der Kultur, ihr Durchmesser liegt bei bis zu 300µm. Die Kardiosphären liegen vereinzelt losgelöst, i.d.R. aber fest mit dem Kulturschalenboden verbunden vor. Die folgende Darstellung fasst die Beobachtungen noch einmal zusammen:

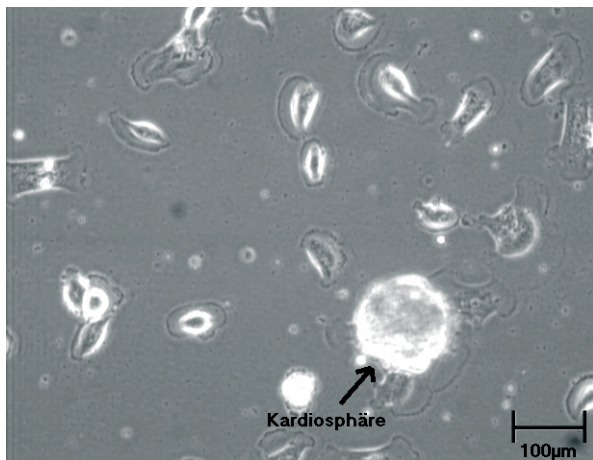
Zelllinie Nr.	Kardiosphären vor Trypsinierung	Kardiosphären nach Trypsinierung	Verfahren zur Kultivierung	Verfahren nach Trypsinierung
4		x	Ch	
5			Ch	
6			Ch	
7	x		Ch	
8		x	Ch	
9		x	Ch	
10		x	Ch	
11		x	Ch	magnetische Separierung
12		x	Ch	magnetische Separierung
13			Ch	
14	(x)		Ch	
15	x		Ch	
16		x	S mA	
17			S mA	
18	x	x	S mA	
19	x	x	S mA	Klonierungszylinder
20	x	x	S mA	
21	x	x	S mA	Differenzierungsversuch
22	x		S mA	
23		x	S mA	Klonierungszylinder
24	x	x	S mA	
25			S mA	
26	x	x	S oA	
27	x	x	S oA/mA	
28	x	x	S oA/mA	
29	x	x	S oA	
30	x		S oA	
31		x	S oA	
32	x	x	S oA	
29	15	19	Anzahl Zellreihen	
		10	Anzahl Zellreihen mit Kardiosphären vor u. nach Trypsinierung	
		5	Anzahl Zellreihen ohne Kardiosphären	

Darst. 17 Übersicht Kardiosphärenbildung

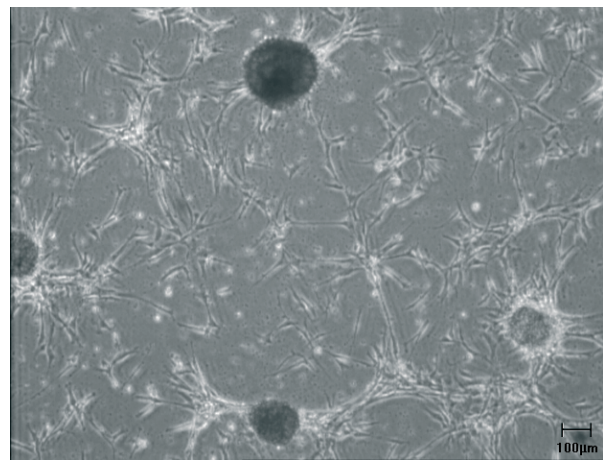
Ch = Zerkleinerung des Gewebes mit TissueChopper; S = Zerkleinerung des Gewebes mit Skalpell; oA = ohne Antrocknen; mA = mit Antrocknen; u. = und, x = Kardiosphäre vorhanden, (x) = Morphologie nicht sicher einer Kardiosphäre zuzuordnen, aufgeführt sind nur Zellreihen, die das gesamte Kultivierungsprotokoll durchliefen, die Bezeichnung der Zellreihen wurde aus Datenschutzgründen geändert.

Daraus ergibt sich die von den ursprünglichen Protokollen abweichende Nomenklatur der CFC und CDC schon vor der Trypsinierung: als Zellen, die Kardiosphären bilden (CFC), wird die Gesamtheit der Zellen auf der Kulturschale vor dem Nachweis von Kardiosphären bezeichnet. Entstehen Kardiosphären schon vor der Trypsinierung, so befinden sich auf der Kulturschale CFC und CDC (Zellen, die aus den Kardiosphären herauswachsen), da die Kardiosphären i.d.R. auf der Kulturschale verbleiben und

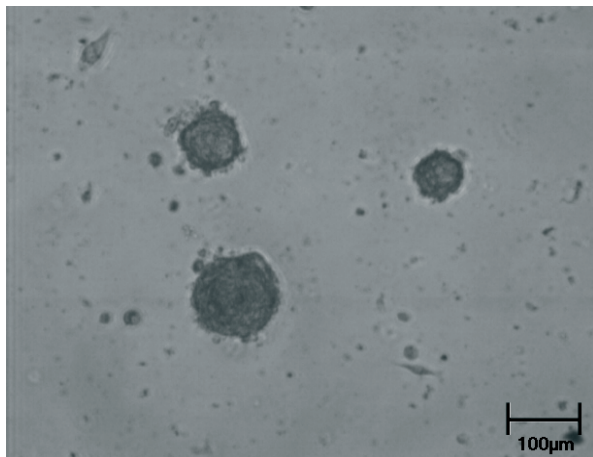
nicht abpipetiert werden. Eine grafische Veranschaulichung dieser Erläuterungen findet sich in Darstellung 6.



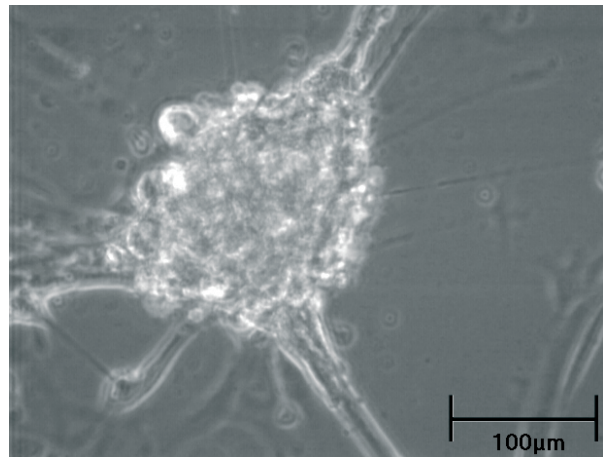
Darst. 18 Primärkultur 29 Tage nach Anlegen, Kardiosphäre im Areal endothelzellartiger Zellen
(Objektivvergrößerung 10x)



Darst. 19 Zelllinie elf Tage nach Trypsinierung, Kardiosphären
(Objektivvergrößerung 4x)

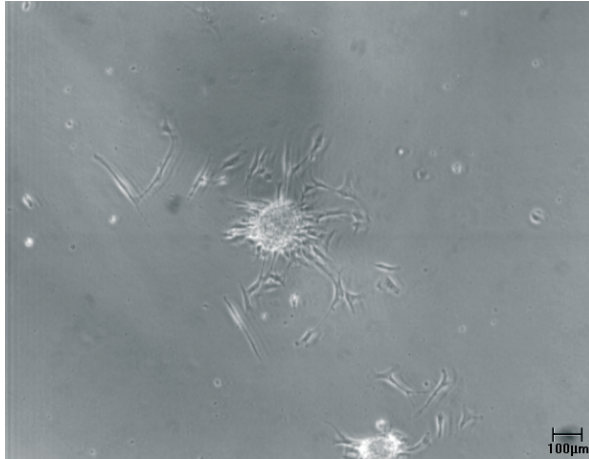


Darst. 20 Zelllinie vier Tage nach Trypsinierung, Kardiosphären
(Objektivvergrößerung 10x)

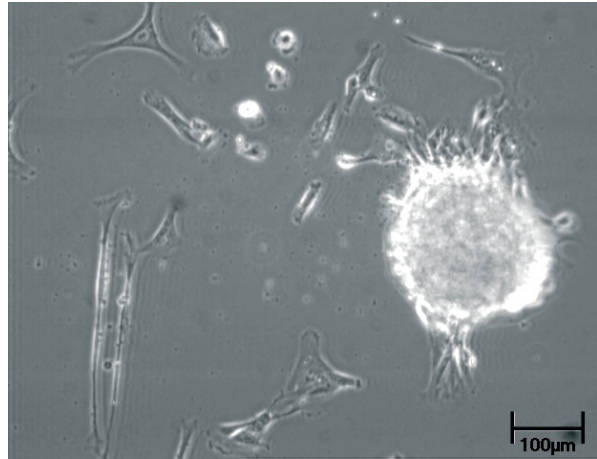


Darst. 21 Zelllinie acht Tage nach Trypsinierung, Bildung einer Kardiosphäre
(Objektivvergrößerung 20x)

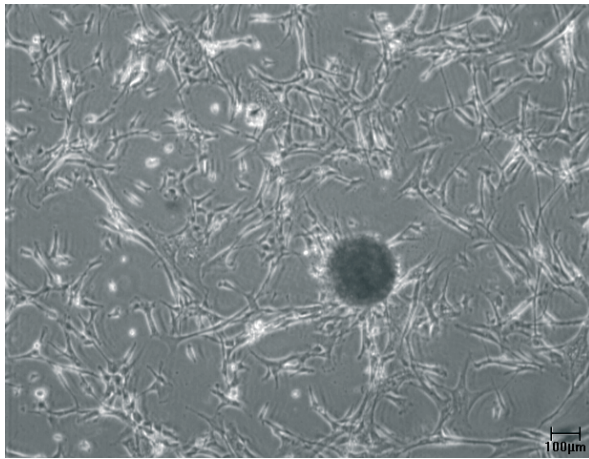
Bei drei Zelllinien werden die Kardiosphären (in Suspension oder festgewachsen) zum Trypsinierungszeitpunkt abpipetiert und neu auf PLL-Kulturschalen ausplattiert (Darst. 22ff.). Sofern die Kardiosphären anhaften, wird das Wachstum der CDC bis zum Erntezeitpunkt dokumentiert, die Morphologie der Zellen ähnelt hierbei den fibroblastenartigen Zellen. Sie proliferieren bis zum Erntezeitpunkt, es bildet sich i.d.R. kein konfluenter Monolayer; mikroskopisch lassen sich keine markanten phänotypischen Änderungen feststellen.



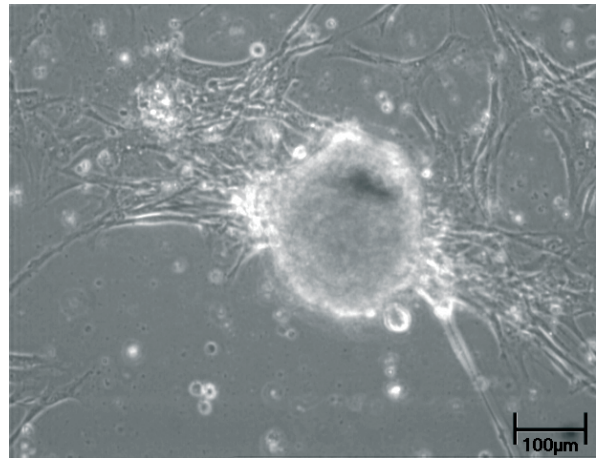
Darst. 22 CDC einen Tag nach Ausplattieren der Kardiosphäre
(Objektivvergrößerung 4x)



Darst. 23 CDC einen Tag nach Ausplattieren der Kardiosphäre
(Objektivvergrößerung 10x)



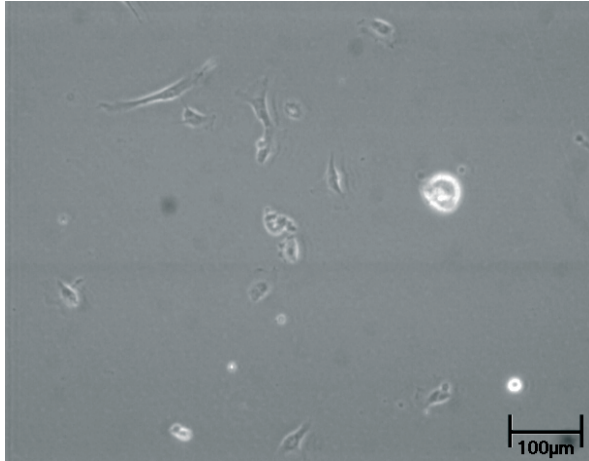
Darst. 24 CDC elf Tage nach Ausplattieren der Kardiosphäre (Objektivvergrößerung 4x)



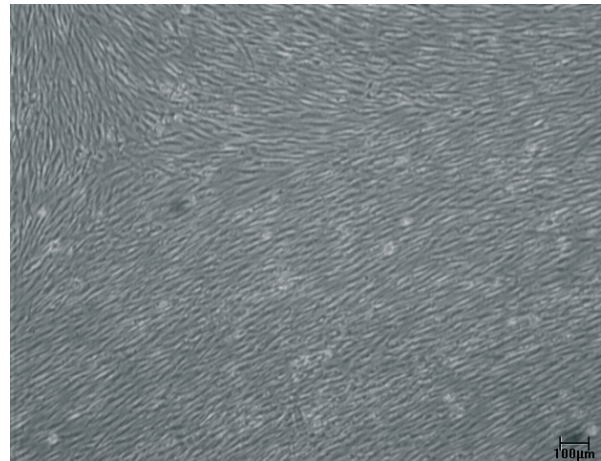
Darst. 25 CDC 14 Tage nach Ausplattieren der Kardiosphäre (Objektivvergrößerung 10x)

Wie aus der Darstellung 17 ersichtlich, werden zwei Zellreihen über eine magnetische Separierung zum Zeitpunkt der Trypsinierung aufgearbeitet. Vor der Trypsinierung befinden sich die bereits zu Beginn des Kapitels beschriebenen Zellen auf den Schalen, jedoch keine Kardiosphären. Demnach wurden die Separierungsversuche mit CFC durchgeführt (Darstellung 26ff.). Die Zellzahl nach der magnetischen Separierung differiert sehr stark zwischen den beiden Zellreihen. Bei geringer Zelldichte liegen die Zellen vereinzelt und bilden lange fadenförmige Ausläufer. Vereinzelt finden sich Zellen mit kompakterem Erscheinungsbild und hell leuchtendem Randsaum. Ein Unterschied zwischen c-Kit und sca-1 isolierten Zellen lässt sich phänotypisch nicht erkennen. Trotz einer verlängerten Kulturphase bis zur Ernte proliferieren die Zellen nicht so weit, dass sie einen Monolayer bilden können. Bei hoher Zelldichte richten sich die Zellen aneinander aus und bilden in einigen Bereichen der Kulturschale einen auffällig geordneten Monolayer. Die mit dem sca-1-Antikörper sortierten Zellen bilden einen lückenhaften Monolayer, die mit dem c-Kit-

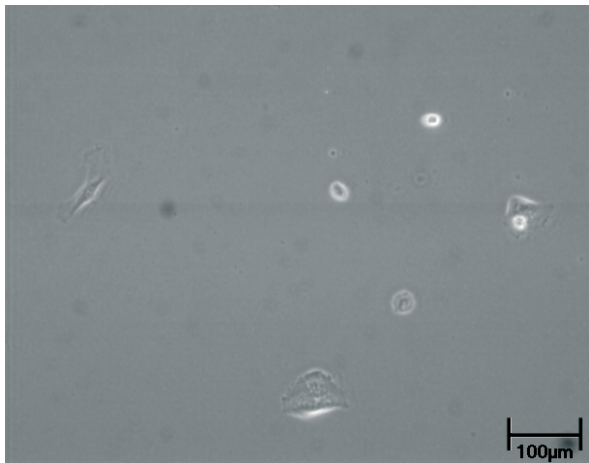
Antikörper selektierten Zellen hingegen liegen dicht aneinander. Die Einzelzellen ähneln mikroskopisch fibroblastenartigen Zellen. Es sind keine Unterschiede zwischen den sca-1 und den c-Kit Zellen zu erkennen. Zusätzlich wird die „negative Selektion“ (d.h. die nicht über die Beads gebundenen Zellen) aus dem Separierungsverfahren kultiviert. Auch hier sind fibroblastenartige Zellen zu erkennen.



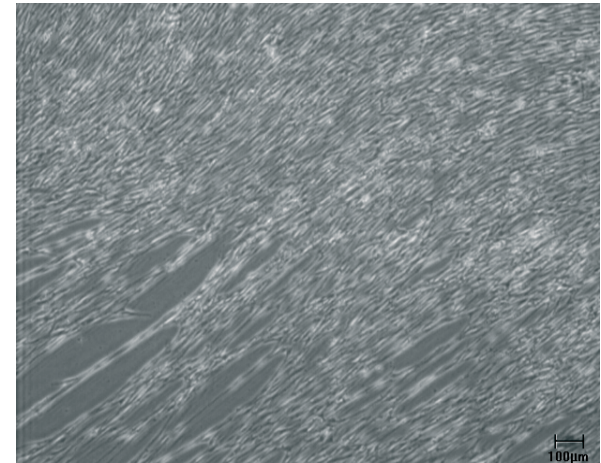
Darst. 26 c-Kit selektierte Zellen vier Tage nach magnetischer Separierung (Objektivvergrößerung 10x)



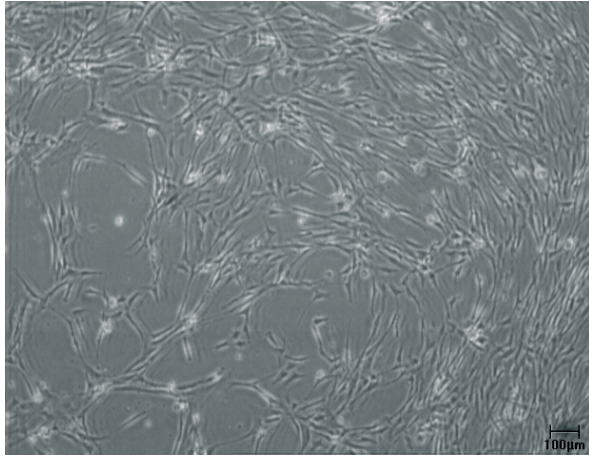
Darst. 27 c-Kit selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung (Objektivvergrößerung 4x)



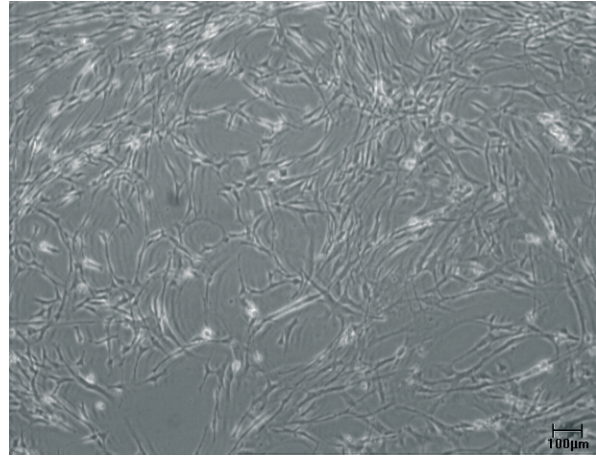
Darst. 28 sca-1 selektierte Zellen vier Tage nach magnetischer Separierung (Objektivvergrößerung 10x)



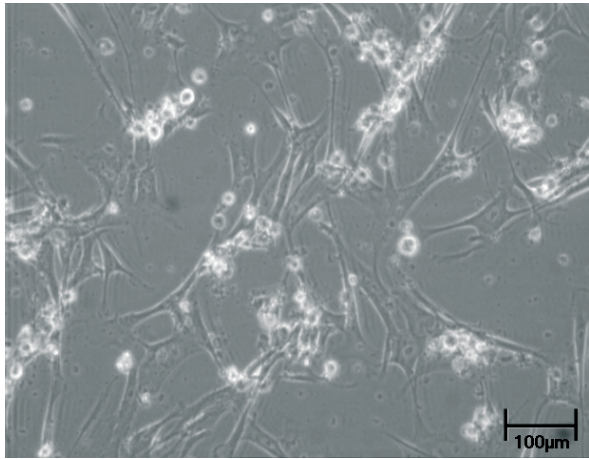
Darst. 29 sca-1 selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung (Objektivvergrößerung 4x)



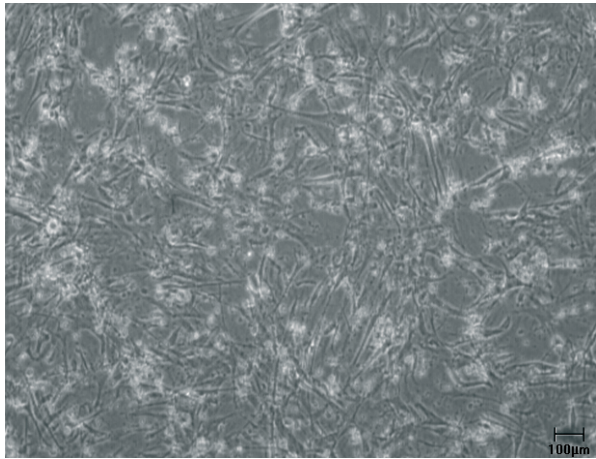
Darst. 30 c-Kit selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung (2) (Objektivvergrößerung 4x)



Darst. 31 sca-1 selektierte Zellen 14 Tage nach magnetischer Separierung (2) (Objektivvergrößerung 4x)



Darst. 32 negative Selektion vier Tage nach magnetischer Separierung (Objektivvergrößerung 10x)



Darst. 33 negative Selektion 14 Tage nach magnetischer Separierung (Objektivvergrößerung 4x)

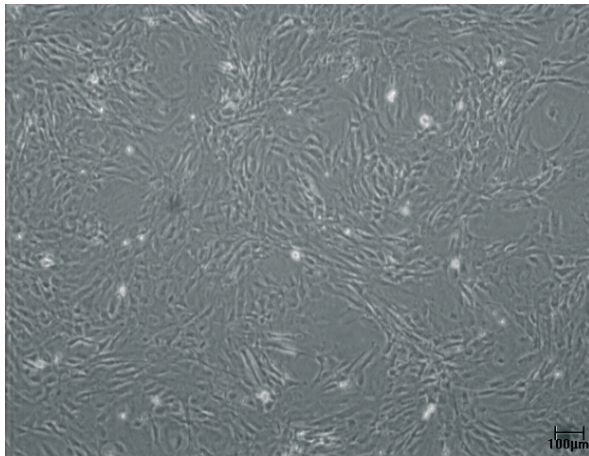
Bei zwei Zelllinien, die schon vor der Trypsinierung deutlich voneinander unterscheidbare Zellbereiche (nämlich die fibroblastenartigen Zellen und die endothelzellartigen Zellen) zeigen, werden zum Zeitpunkt der Trypsinierung Klonierungszylinder eingesetzt. Diese bestehen aus Polystyren und sind im Innendurchmesser zwischen 0,48 und 0,95cm groß. Auf diese Weise können gezielt nur Zellen des entsprechenden Bereichs trypsiniert und auf neue Kulturschalen übertragen werden. Die endothelzellartigen Zellen liegen vereinzelt vor und proliferieren weniger stark als die fibroblastenartigen Zellen, welche bis zur Ernte nahezu konfluent werden.

Um einen möglichen Einfluss der Beschichtung der Kulturschale auf die Zellmorphologie zu beurteilen, wird exemplarisch die Kultivierung auf PDL Schalen durchgeführt: Die Morphologie der Zellen unterscheidet sich mikroskopisch nicht, es

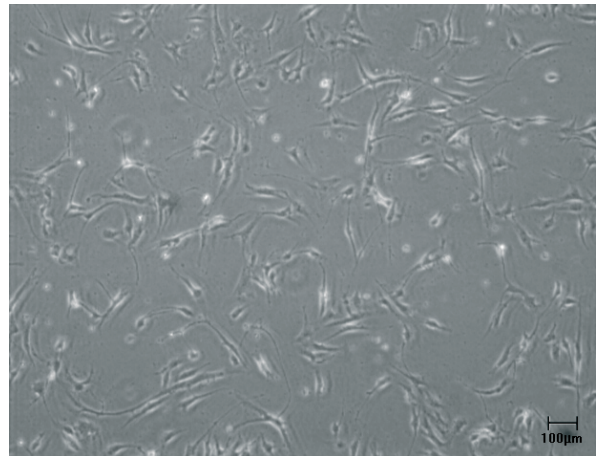
entstehen auf beiden Beschichtungsformen (PLL und PDL) Kardiosphären; die Einzelzellen besitzen eine fibroblastenartige Morphologie.

Fibroblasten und Endothelzellen

Die Fibroblastenkulturen der Maus werden ausplattiert übernommen und sind zu diesem Zeitpunkt bereits relativ dicht gewachsen (Darstellung 34). Die Einzelzellen sind spindelförmig, besitzen einen prominenten ovalen Zellkern mit mehreren Nukleoli und wachsen ungeordnet. Ihre Morphologie ändert sich nach Trypsinierung nicht. Während der gesamten Kultivierungszeit proliferieren sie in einem hohen Maß. Die humanen Fibroblasten werden eingefroren übernommen und ausplattiert (Darstellung 35). Die Zelldichte ist deutlich geringer als die der aus Primärkulturen gewonnenen Fibroblasten der Maus, sie besitzen einen spindelförmigen Phänotyp mit langen Zellausläufern und einem zu Beginn der Kultivierung schaumigen Zytoplasma. Die Zellen scheinen sich im Verlauf der Kultivierung zu erholen, sie proliferieren verhalten bis zum Zeitpunkt der Ernte. Kardiosphären sind in beiden Kulturen nicht vorhanden.



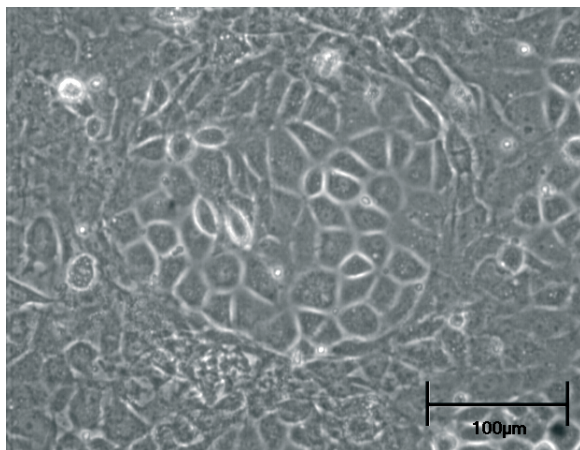
Darst. 34 Fibroblasten der Maus, einen Tag nach Erhalt
(Objektivvergrößerung 4x)



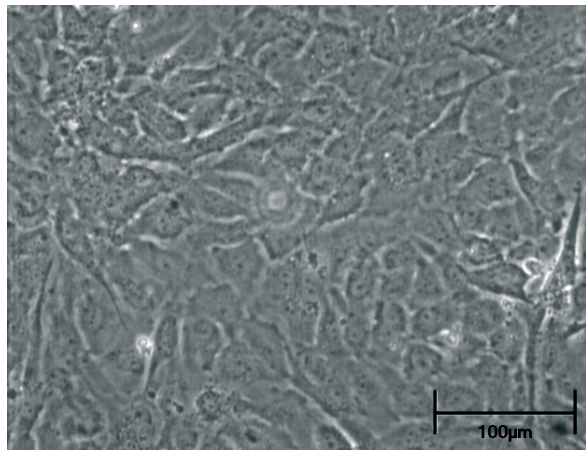
Darst. 35 Humane Fibroblasten aus Lungengefäßen zwei Tage nach Trypsinierung
(Objektivvergrößerung 4x)

Die kultivierten Endothelzellen der Ratte wachsen zu Beginn in multiplen Inseln, die über den Verlauf der Kultur konfluent werden. Die Proliferation ist sehr hoch, die Zellen liegen mit ihren Zellgrenzen direkt aneinander, so dass ein Kopfsteinpflastermuster erzeugt wird. Ihr Zytoplasma erweckt einen granulären Eindruck, der Rand erscheint im Phasenkontrast hell leuchtend. Die Zellen besitzen einen Zellkern mit einem oder mehreren Nukleoli. In einer Kultur findet man nach

Trypsinierung eine Kardiosphären-ähnliche Struktur. Die humanen Endothelzellen (HUVEC) werden bereits ausplattiert übernommen und sind entsprechend dicht gewachsen (Darstellung 36 und 37). Sie besitzen einen ovalen Zellkern mit mehreren Nukleoli, der perinukleäre Bereich erscheint granuliert, das restliche Zytoplasma liegt kreisförmig um den Kern verteilt. Die Zellen liegen mit ihren Zellgrenzen dicht nebeneinander. Ihre Morphologie ändert sich nach dem Trypsinieren mikroskopisch nicht. Kardiosphären sind auch in diesen Kulturen nicht zu sehen.



Darst. 36 kardiale Endothelzellen der Ratte fünf Tage nach Ausplattieren (Objektivvergrößerung 20x)



Darst. 37 HUVECs fünf Tage nach Erhalt (Objektivvergrößerung 20x)

4.2 Charakterisierung der CFC und CDC

4.2.1 Western Blot

Die Proteinexpression der CFC bzw. CDC wird mit Hilfe des Western Blots zum Trypsinierungs- und zum Erntezeitpunkt qualitativ untersucht. Zusätzlich werden die ausplattierten Kardiosphären, die über die Klonierungszylinder separierten Zellen und die Zellen, die zum Trypsinierungszeitpunkt mit Hilfe der magnetischen Beads positiv und negativ selektiert wurden nach ihrer Ernte aufgearbeitet. Zum Vergleich werden humane Herzgewebeproben, die direkt nach der Entgegennahme eingefroren wurden, in Verdünnungsstufen von 50-100μg/20μl verwendet. Die Entwicklung der Membranen erfolgt zunächst immer über die verstärkte Chemilumineszenz (ECL) und anschließend ergänzend über eine Färbung mit Hilfe des Enzyms alkalische Phosphatase (AP). Es werden insgesamt 13 Marker untersucht (Troponin, sca-1, c-Kit, isl-1, Vimentin, CD31, vWF, FSP1, GATA4, Nkx-2.5, β-MHC, Aktin und α-actinin). Banden lassen sich bei Vimentin und GATA4 für

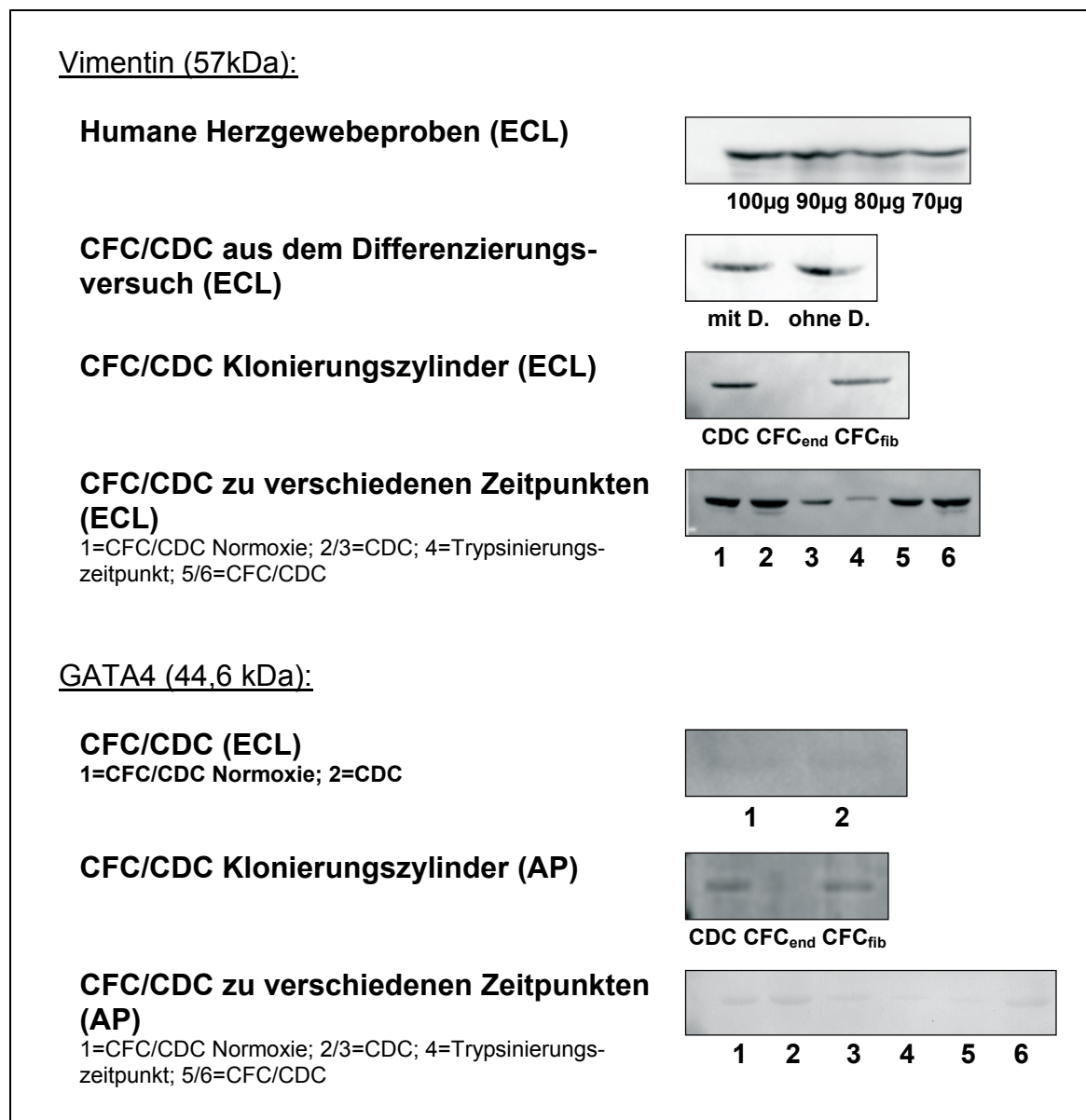
die CFC/CDC wiederholt darstellen, weshalb nur diese Ergebnisse aufgeführt werden. Es zeigen sich keine Banden für die Stammzellmarker c-Kit und sca-1. Dies auch nicht bei den anhand ebendieser Marker magnetisch positiv und negativ selektierten Zellen.

Untersuchte Zellreihe Nr.	Vimentin		GATA4		Verfahren
	AP	ECL	AP	ECL	
11 T					Trypsinierungszeitpunkt
13 T					Trypsinierungszeitpunkt
15 T	+	+	(+)	(+)	Trypsinierungszeitpunkt
11 (sca-1)			-	-	magnetische Separierung
11 (c-Kit)			-	-	magnetische Separierung
12 (neg. Selektion)			(+)	-	magnetische Separierung
12 (sca-1)			(+)	-	magnetische Separierung
12 (c-Kit)			(+)	-	magnetische Separierung
13 4h					Hypoxie
13 8h					Hypoxie
13 Nox					Normoxie
26 Nox	+	+	(+)	(+)	Normoxie (CFC/CDC)
19 CS	+	+	+	-	Kardiosphären (CDC)
16 CS	+	+	(+)	(+)	Kardiosphären (CDC)
21 CS	+	+	(+)	(+)	Kardiosphären (CDC)
18	+	+	(+)	(+)	CFC/CDC
22	+	+	(+)	(+)	CFC/CDC
19 (fibroblastenartige)	+	+	+	-	Klonierungszyylinder
19 (endothelzellartige)	-	-	-	-	Klonierungszyylinder
33 G			(+)	-	humanes Herzgewebe (50µg/20µl)
33 G	+	+	(+)	-	humanes Herzgewebe (70µg/20µl)
33 G	+	+	(+)	-	humanes Herzgewebe (80µg/20µl)
33 G	+	+	(+)	-	humanes Herzgewebe (90µg/20µl)
33 G	+	+	(+)	-	humanes Herzgewebe (100µg/20µl)
21	+	+	(+)	(+)	Differenzierung
21	+	+	+	(+)	ohne Differenzierung
34	-	-	-	-	Ernte zwei Wochen

Darst. 38 Übersicht Zelllinien und Herzgewebe untersucht im Western Blot, die Nummerierung entspricht derjenigen in Darst.17, Stammzellrezeptoren sind zu jedem Zeitpunkt negativ, + = positiv, - = negativ, (+) = Nachweisgrenze, T = Trypsinierungszeitpunkt, neg.Selektion = negative Selektion, G = Herzgewebe „Ganzherz“, CS = cardiosphere (Kardiosphäre)

Als an der Nachweisgrenze liegend werden solche Banden eingestuft, die in ihrer Höhe auf der Membran Abweichungen von der optimalen Höhe des Markerproteins aufweisen, sehr schwach sind oder deren unspezifischer Anteil nicht abgrenzbar ist.

Exemplarische Bilder der Nachweise von Vimentin und GATA4 beider Verfahren sind im Folgenden abgebildet:



Darst. 39 Übersicht der Western Blot Banden; CFC_{end} = endothelzellartige Zellen; CFC_{fib} = fibroblastenartige Zellen; mit D.= Zelllinie die Differenzierungsprotokoll durchlaufen hat; ohne D.= gleiche Zelllinie ohne Differenzierungsprotokoll kultiviert

Wie aus der Darstellung 38 und der Darstellung 39 ersichtlich, erfolgen die qualitativen Untersuchungen an CFC und CDC unabhängig von ihren weiteren Versuchsbedingungen und sowohl nach vierwöchiger als auch nach sechswöchiger Kultur. Deutlich wird die stete Expression von Vimentin in allen Versuchsbedingungen und zu allen Zeitpunkten, wohingegen der Nachweis von GATA4 als herzspezifischer Marker deutlich schwieriger ist und bei den Stammzellmarkern auf Proteinebene gänzlich misslingt. Weder der

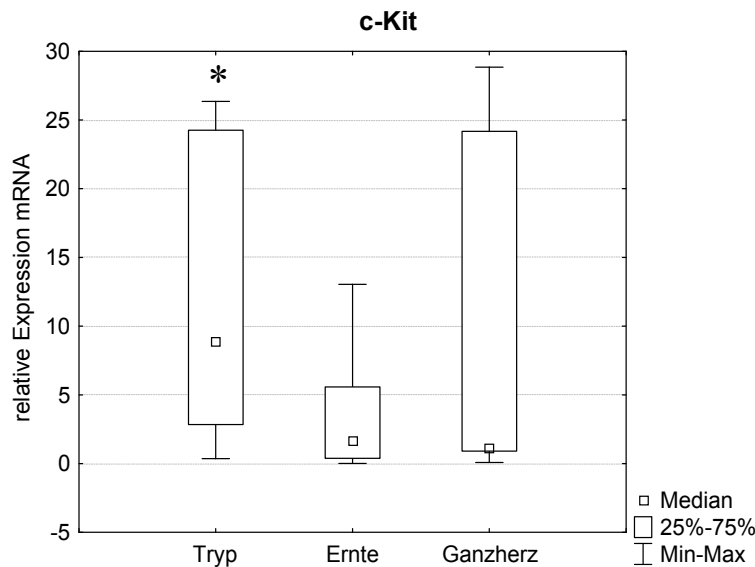
Differenzierungsversuch noch die Hypoxieversuche haben innerhalb der jeweils gewählten Versuchsbedingung den Verlust der Expression von Vimentin als Strukturprotein und mesenchymaler Marker zur Folge. Gleiches gilt für die Kultivierung der CDC, also nach Abnahme und neuem Ausplattieren der Kardiosphären. Das negative Ergebnis der Vimentinexpression der Zelllinie nach Separierung über die Klonierungszylinder und der Primärkultur nach zwei Wochen Kultivierung könnte eine Folge der geringen „Zellausbeute“ sein, die dieser Methode geschuldet ist. Eine quantifizierende bzw. eine repräsentative Aussage ist unter den hier gewählten Bedingungen nicht möglich.

4.2.2 PCR

Die Charakterisierung der CFC bzw. CDC erfolgt ergänzend zur Detektion der Proteinexpression auch auf der Ebene der Transkription anhand der Sequenzen für sca-1, c-Kit, isl-1, Vimentin, FSP1, VEGF und Troponin. Letzteres wird nicht dargestellt, da die Expression i.d.R. sehr gering ausfällt. Untersucht werden die nach der in Kapitel 3.4.3.4 beschriebenen Methode geernteten CFC/CDC und die Zelllinie des Differenzierungsversuchs, welche in einem gesonderten Kapitel besprochen wird. Die Gruppenbildung erfolgt anhand des Zeitpunktes des Kultivierungsendes der (Teil-)Zellkultur (also nach sechswöchiger Kultur (=Ernte) und/oder zum Trypsinierungszeitpunkt (=Tryp). Erklärend sei erwähnt, dass ein Kultivierungsende zum Trypsinierungszeitpunkt nicht die gesamte Zelllinie betrifft, vielmehr wird ein Teil der zu trypsinierenden Kulturschale geerntet. Die restlichen Zellen werden nach der Trypsinierung weiter kultiviert). Zelllinien, die folglich sowohl zum Trypsinierungszeitpunkt als auch zur Ernte nach sechs Wochen untersucht werden, werden als abhängige Stichproben zusätzlich separat ausgewertet und den unabhängigen Stichproben gegenübergestellt. Die Gruppen unterscheiden sich insofern von den Western Blot Untersuchungen, als dass keine Einzelergebnisse jeder Zelllinie für sich, sondern das Gesamtergebnis verschiedener Zelllinien einer Gruppe dargestellt werden. Es werden keine isolierten und neu ausplattierten Kardiosphären mit Bildung von CDC untersucht. Außerdem enthalten die Gruppen keine Proben, die über Klonierungszylinder oder die magnetische Separierung trypsinisiert wurden. Eine Ausnahme zur Darstellung eines Gesamtergebnisses ist die exemplarische Gruppengröße bei dem durchgeführten Differenzierungsversuch und die damit einhergehende eingeschränkte Interpretationsfähigkeit dieses Versuchs.

Als Kontrolle werden humane Herzgewebeproben („Ganzherz“) gewählt (die Normierung erfolgt bei allen Darstellungen auf den Median ebendieser Gruppe), die Ergebnisse drücken die relative Expression der jeweiligen Sequenz in Bezug auf das „Housekeeping-Gen“ hprt in den untersuchten Gruppen gegenüber der Kontrolle aus.

Unabhängige Stichproben

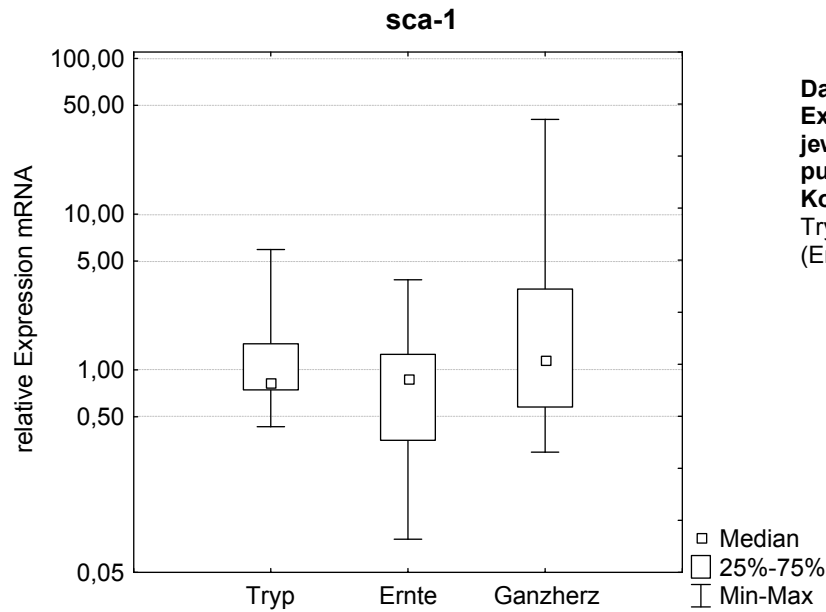


Darst. 40 relative mRNA-Expression von c-Kit zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), Tryp = Trypsinierung, * = $p < 0,05$ Tryp vs. Ernte, $n=11$ (Tryp) $n=22$ (Ernte) bzw. $n=5$ (Ganzherz)

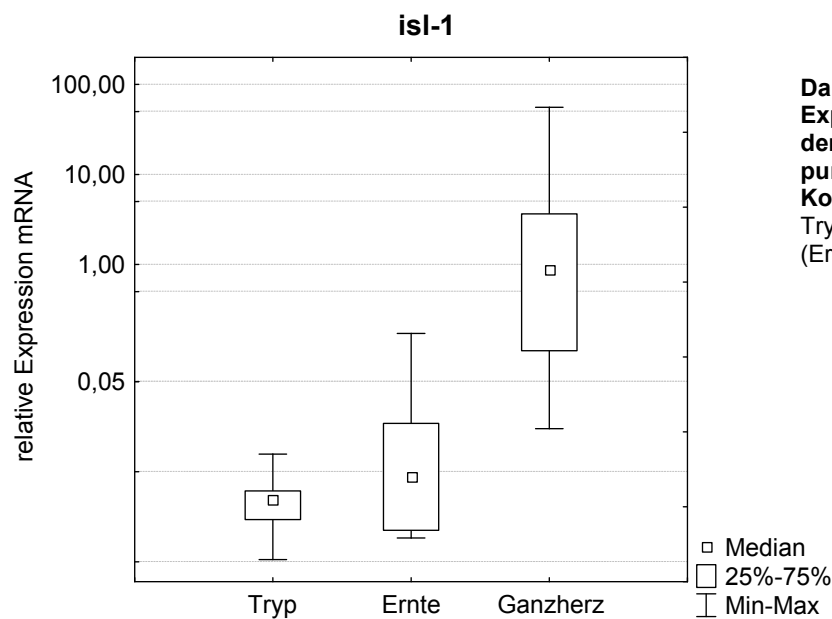
Dargestellt ist im Box-Whisker-Plot die relative Expression der mRNA in Bezug auf den Zeitpunkt der Untersuchung.

Für die Stammzellmarker fällt eine relativ große Streuung in allen Gruppen auf. Insbesondere c-Kit variiert in der relativen Expression der Kontrolle extrem (0,08 bis 24,16fache relative Expression). Zum Trypsinierungszeitpunkt zeigt sich dennoch eine signifikant höhere Expression von c-Kit im Vergleich zum Erntezeitpunkt. Betrachtet man die relative Expression von sca-1, finden sich in der Kontrolle stark variierende relative mRNA-Gehalte. Allerdings ist die Verteilung der Werte im Vergleich Trypsinierungszeitpunkt-Erntezeitpunkt etwas konstanter. Zudem werden c-Kit und sca-1 sowohl in den Ganzherzproben als auch in den kultivierten Zellen nachgewiesen. Isl-1 hingegen wird lediglich in den Ganzherzen nachweisbar exprimiert. Die Werte zu den anderen Zeitpunkten sind vernachlässigbar klein.

Somit kann im Falle von sca-1 und isl-1 bei den unabhängigen Stichproben nicht davon ausgegangen werden, dass nach dem Trypsinierungszeitpunkt eine mögliche Differenzierung einsetzt, welche die Expression dieser Stammzellmarker herunterreguliert.



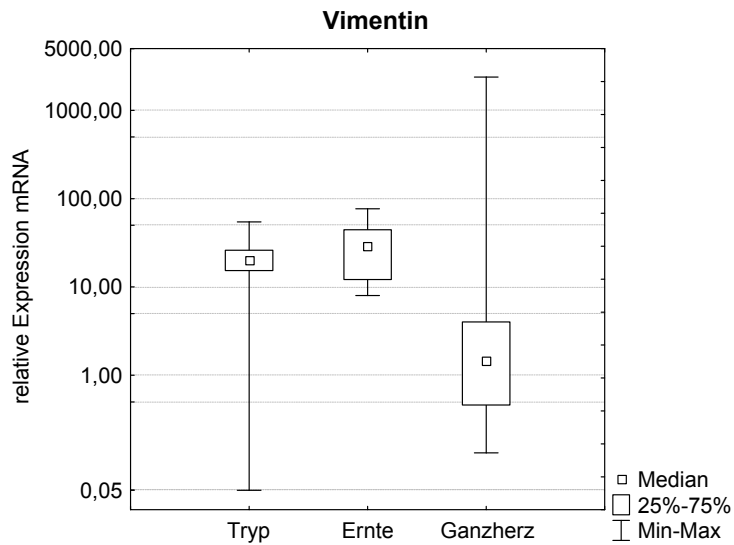
Darst. 41 relative mRNA-Expression von sca-1 zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), Tryp = Trypsinierung, n=11 (Tryp), n=24 (Ernte), n=19 (Ganzherz)



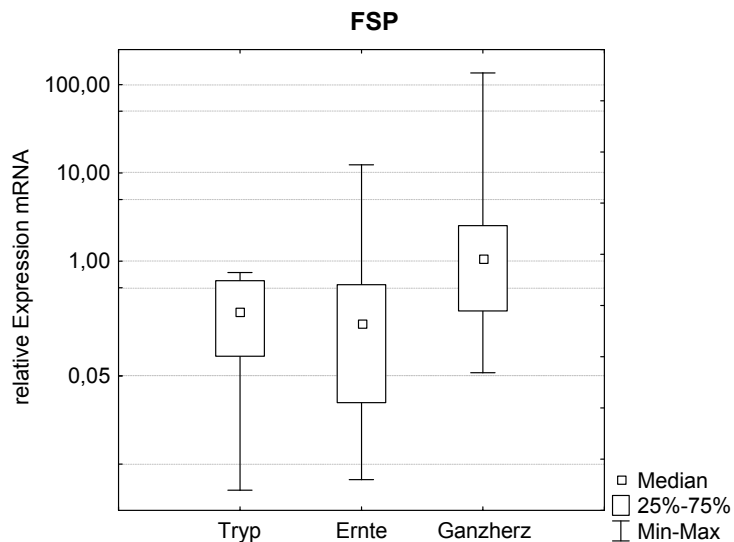
Darst. 42 relative mRNA-Expression des isl-1-Proteins zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), Tryp = Trypsinierung, n=8 (Tryp), n=19 (Ernte), n=19 (Ganzherz)

Zur weiteren Charakterisierung werden Strukturproteine (Vimentin, FSP) und VEGF untersucht. In keinem Fall lassen sich im Vergleich Trypsinierung zu Ernte signifikante Unterschiede darstellen. Vielmehr fällt auch hier eine inkonstante Expression mit relativ hoher Streuung innerhalb der Gruppen auf. Interessant ist der Unterschied in der Expression der Strukturproteine Vimentin und FSP. Ersteres gilt als unspezifischer mesenchymaler Marker, letzteres entsprechend seinem Namen als fibroblastenspezifisch. Dennoch zeigt sich, dass Vimentin deutlich positiv (d.h. bis zu ca. 50fach höhere Expression im Vergleich zu hprt in Bezug auf die Kontrolle)

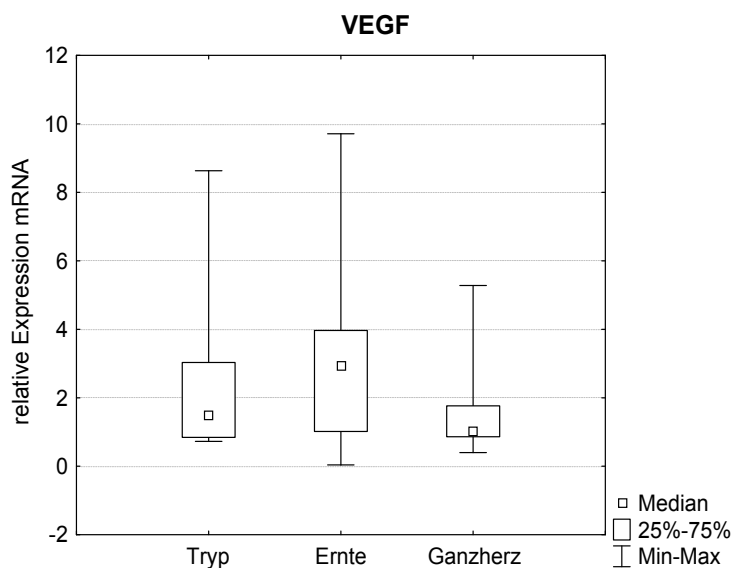
exprimiert wird, wohingegen FSP zu allen Zeitpunkten gerade an der Nachweisgrenze liegt.



Darst. 43 relative mRNA-Expression von Vimentin zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), Tryp = Trypsinierung, n=9 (Tryp), n=23 (Ernte), n=19 (Ganzherz)



Darst. 44 relative mRNA-Expression von FSP zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), Tryp = Trypsinierung, n=9 (Tryp), n=23 (Ernte), n=19 (Ganzherz)

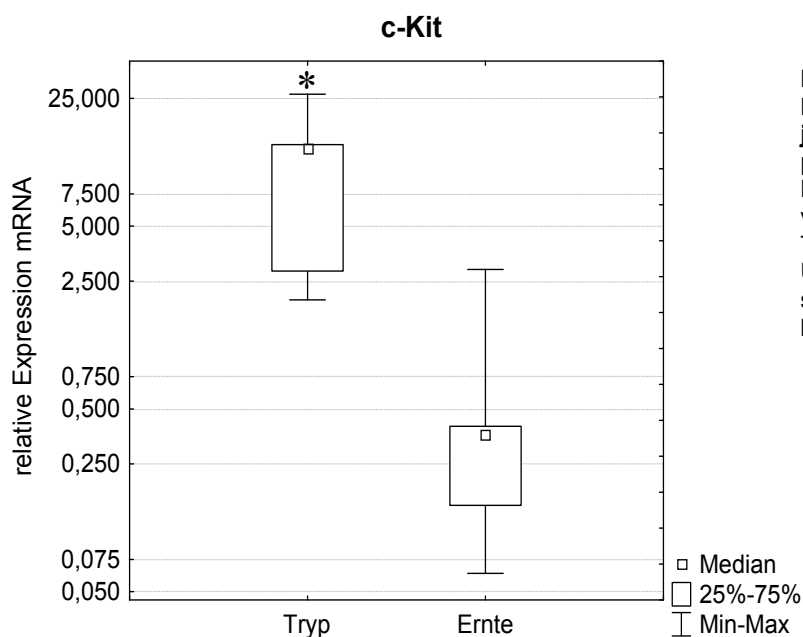


Darst. 45 relative mRNA-Expression von VEGF zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), Tryp = Trypsinierung, n=11 (Tryp), n=24 (Ernte), n=19 (Ganzherz)

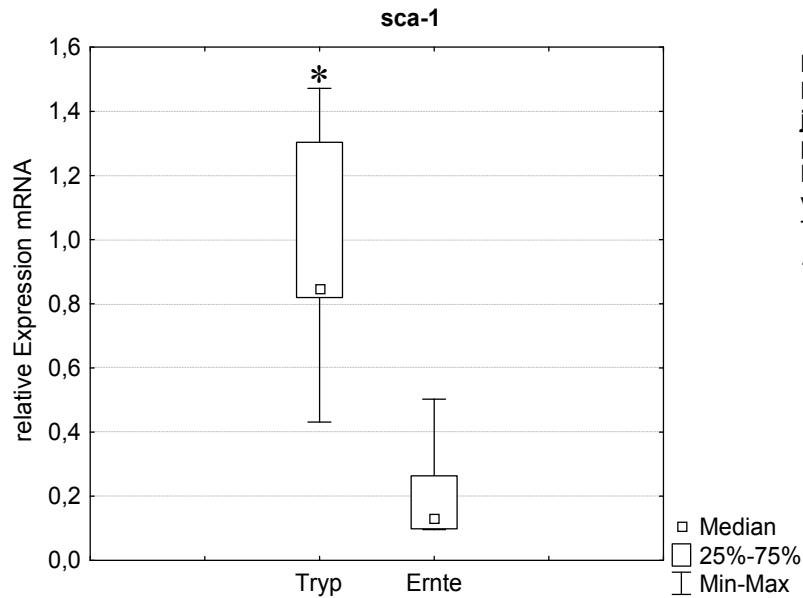
In der Expression des VEGF zeigen sich keine Unterschiede. Zu beachten ist, dass es sich hier um die Darstellung der relativen mRNA-Expression von Zellen handelt, die keiner Hypoxie ausgesetzt wurden.

Abhängige Stichproben

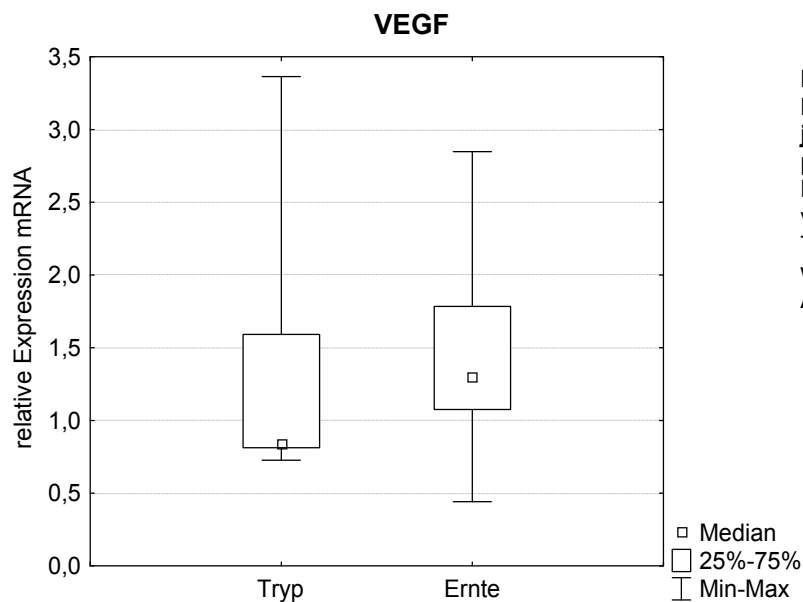
Einen ergänzenden Einblick gewähren die Ergebnisse folgender fünf Zellreihen (Nr. 35/36/37/5 und 11, die Nummern entsprechen denen aus Darstellung 17 und 38), die sowohl zum Trypsinierungs- als auch zum Erntezeitpunkt untersucht und somit als abhängige Stichproben separat ausgewertet werden. Auch hier ist die Kontrolle die Gruppe der Herzgewebeprobe, normiert wird auf den Median (~1; in den Graphen nicht dargestellt). Bemerkenswert sind in dieser Versuchsanordnung die Expressionen der Stammzellmarker c-Kit und sca-1 (isl-1 liegt an der Nachweisgrenze und wird nicht dargestellt) gegenüber dem Erntezeitpunkt, da sie sich als signifikant erhöht darstellen, wohingegen die Expression des VEGF auch hier keine Veränderungen zeigt.



Darst. 46 relative mRNA-Expression von c-Kit zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), verbundene Stichproben, Tryp = Trypsinierung, * = $p < 0,05$, Ursprungsdaten wurden zur statistischen Auswertung logarithmiert.



Darst. 47 relative mRNA-Expression von sca-1 zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), verbundene Stichproben, Tryp = Trypsinierung, * = $p < 0,05$.

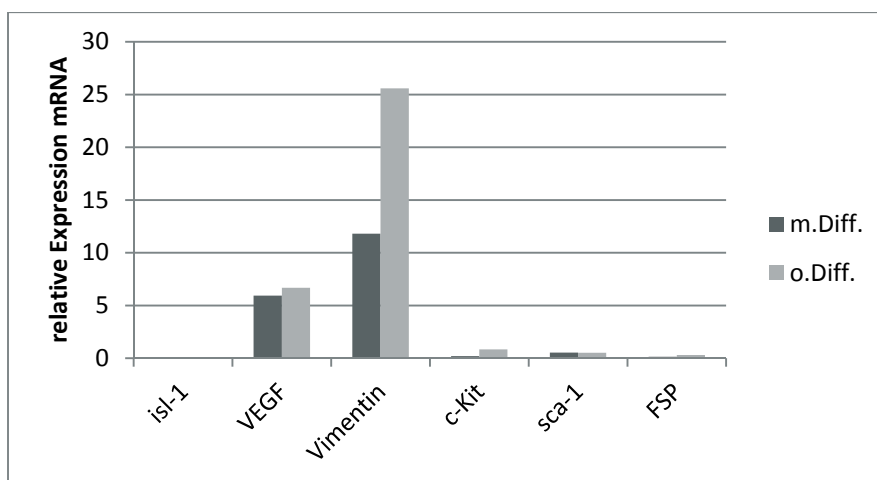


Darst. 48 relative mRNA-Expression von VEGF zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz), verbundene Stichproben, Tryp = Trypsinierung, Ursprungsdaten wurden zur statistischen Auswertung logarithmiert.

4.2.3 Differenzierungsversuch

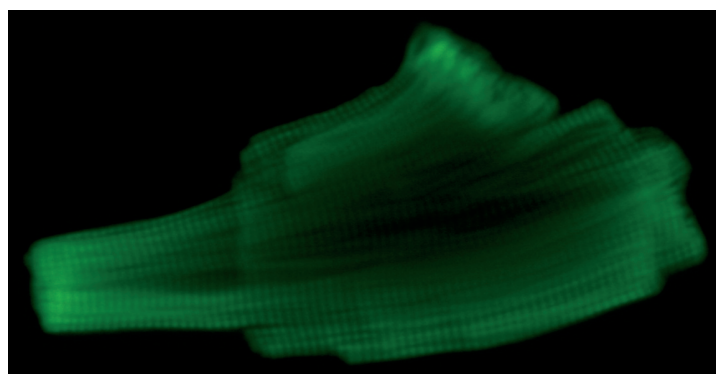
Exemplarisch wird der Versuch einer Differenzierung der CFC/CDC einer Zellreihe in Richtung Kardiomyozyte über 5-Azacytidin unternommen und die Zellen zum Erntezeitpunkt, wie bereits beschrieben, im Western Blot und in der PCR untersucht. Das Anlegen dieser Zellkultur erfolgt ohne die Prozedur des Antrocknens, die auswandernden Zellen zeigen keine Besonderheit im Vergleich zu den übrigen Kulturen; die Zelldichte nach der Trypsinierung liegt mit ~ 47000 Zellen/ml im unteren Bereich. Es werden parallel die gleiche Anzahl Schalen, die das Protokoll durchlaufen und solche, die als Kontrolle nur einem Medienwechsel ohne die Zugabe von Azacytidin/Ascorbinsäure unterzogen werden, angelegt. Kardiosphären zeigen

sich sowohl vor als auch nach der Trypsinierung, d.h. in den Differenzierungsversuch sind sowohl CFC als auch CDC einbezogen. Es zeigen sich qualitativ keine Veränderungen in der Proteinexpression der untersuchten Marker: alle sind sowohl mit als auch ohne Differenzierungsprotokoll nachweisbar. Eine Erhöhung von Troponin, dessen Expression bei einer Differenzierung in Richtung Kardiomyozyte erwartungsgemäß steigen sollte, bzw. eine verminderte Expression von Stammzellmarkern lässt sich nicht zeigen. Vimentin hingegen ist in diesem Versuch (n=1) in beiden Ansätzen gegenüber den übrigen untersuchten Markern deutlich erhöht exprimiert, gleichwohl eine statistisch verifizierte Aussage nicht möglich ist.



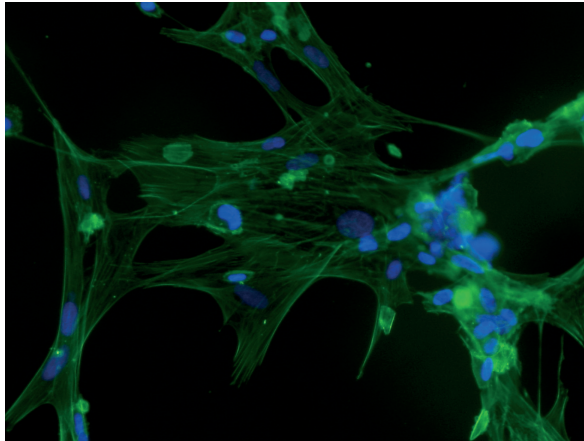
Darst. 49 relative mRNA-Expression verschiedener Proteine in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz, nicht dargestellt), verbundene Stichprobe, m.Diff = mit Differenzierungsprotokoll, o.Diff = ohne Differenzierungsprotokoll, n=1, deshalb Darstellung nur eines Messwertes.

Ergänzend zu diesen Verfahren wird nun ebenfalls die Morphologie der behandelten und nicht behandelten Zellen wöchentlich vergleichend über eine Phalloidininfärbung dargestellt, in der Absicht im optimalen Fall eine Organisation der Zellstrukturen in eine Querstreifung zu dokumentieren. Als Positivkontrolle zur Darstellung der Querstreifung dienen ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte.

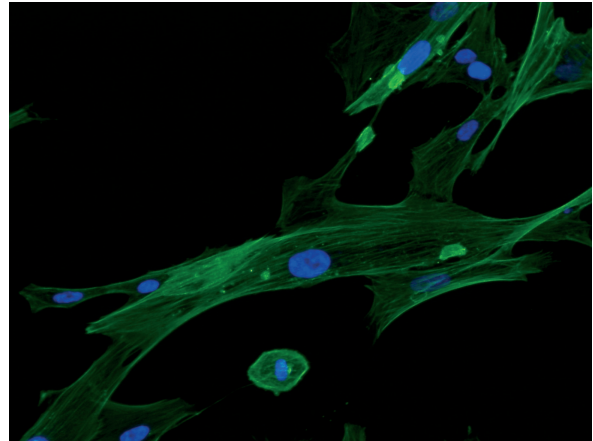


Darst. 50 Sarkomerstruktur einer ventrikulären Kardiomyozyte der Ratte, Objektivvergrößerung ~ 60x

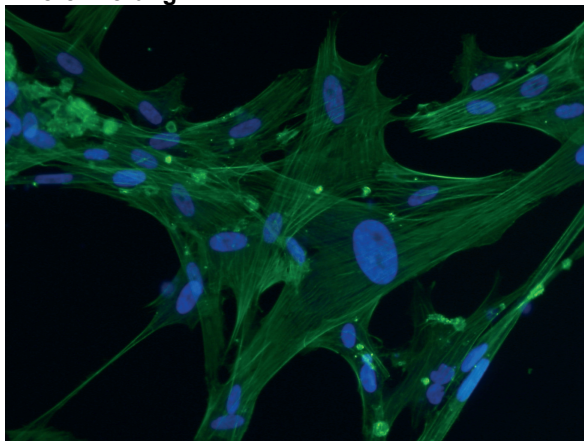
Wie die nachfolgenden Bilder zeigen (Objektivvergrößerung 10-20x), lassen sich mikroskopisch keine morphologischen Veränderungen über den gesamten Verlauf des Experimentes zwischen den Zellen feststellen; auch die Proliferation der Zellen in Kultur scheint nicht beeinflusst.



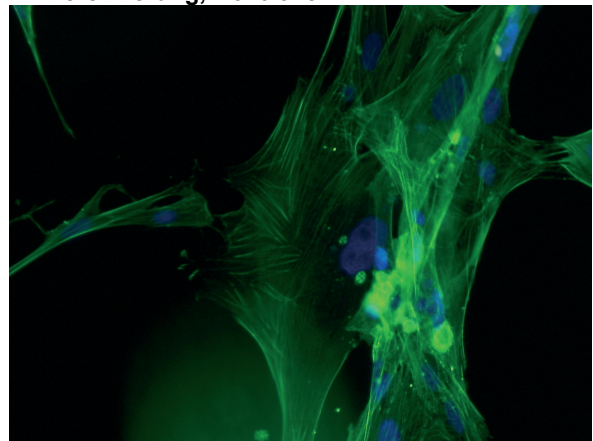
Darst. 51 CFC/CDC eine Woche nach Beginn der Differenzierung



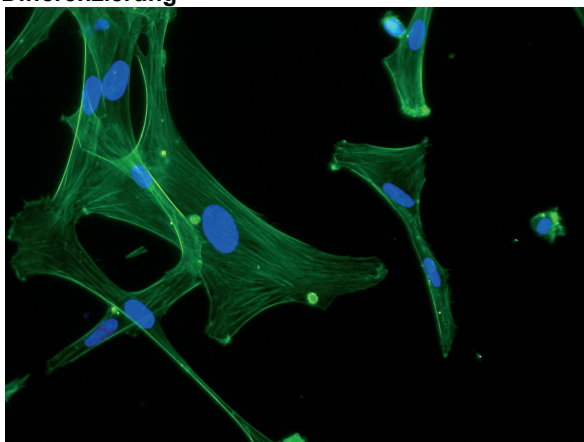
Darst. 52 CFC/CDC eine Woche nach Beginn der Differenzierung, Kontrolle



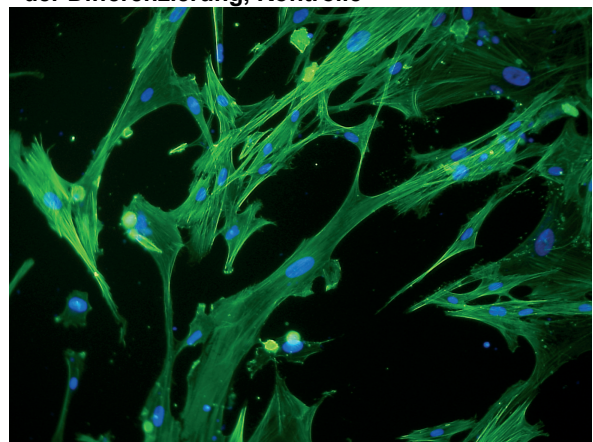
Darst. 53 CFC/CDC zweite Woche nach Beginn der Differenzierung



Darst. 54 CFC/CDC zweite Woche nach Beginn der Differenzierung, Kontrolle



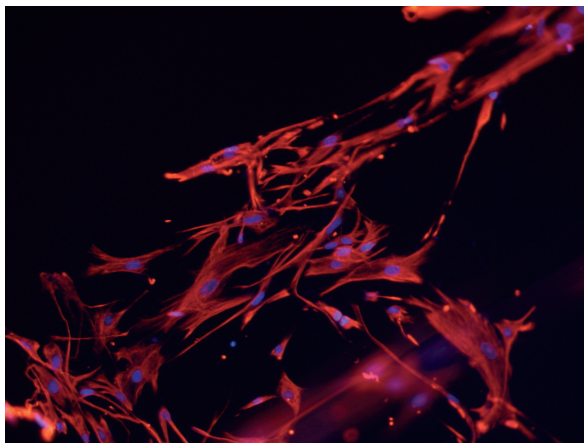
Darst. 55 CFC/CDC dritte Woche nach Beginn der Differenzierung



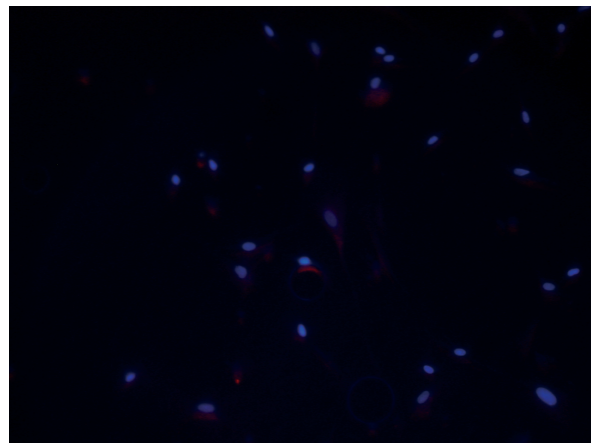
Darst. 56 CFC/CDC dritte Woche nach Beginn der Differenzierung, Kontrolle

4.2.4 Immunfluoreszenz

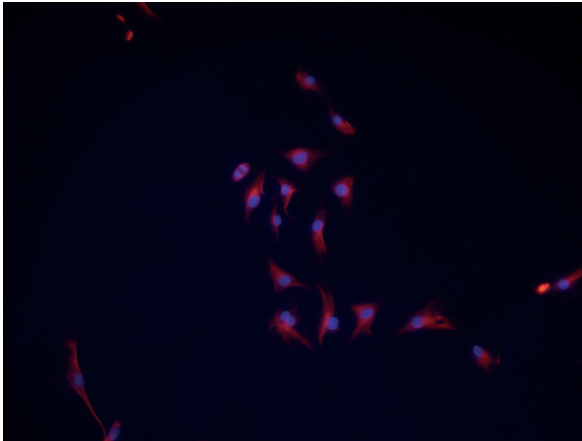
Immunfluoreszenznachweise werden sowohl für murine Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten als auch für HUVEC und humane Fibroblasten durchgeführt (Objektivvergrößerung 10-20x). Außerdem werden humane Zelllinien (CFC/CDC), die das Kultivierungsprotokoll über sechs Wochen durchlaufen haben, im Zeitraum von der Trypsinierung bis zur Ernte untersucht. Die verwendeten primären Antikörper sind c-Kit, CD31, FSP1, sca-1, Troponin, Vimentin und vWF. In der Regel wird ein im roten Bereich des Spektrums fluoreszierender Cy3 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Zusätzlich werden die Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffs HOE (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Als Positivkontrolle dienen die murinen und humanen Endothelzell- bzw. Fibroblastenkulturen. Außerdem wird ein Nachweis auf Vimentin an einer Kultur ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte durchgeführt. Übereinstimmend mit den Western Blot Ergebnissen kann nur Vimentin wiederholt als deutlich positives Signal detektiert werden, dies aber neben den Untersuchungen an CFC/CDC sowohl in Endothelzellkulturen als auch in Fibroblastenkulturen, welches der Eigenschaft des Vimentin als mesenchymalem Marker entspricht. Intakte ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte lassen sich mit den verwendeten Antikörpern gegen Vimentin nicht anfärben. Ein schwach positiver Nachweis von vWF und c-Kit wird einmalig dokumentiert. Da im Falle des c-Kit als Oberflächenrezeptor dieser Nachweis nur bei permeabilisierten Zellen gelingt und der Nachweis des vWF nicht reproduzierbar und deutlich schwächer als der des Vimentins ist, werden diese Nachweise als fraglich eingestuft. Demnach muss davon ausgegangen werden, dass Zellen mit mesenchymaler Charakteristik ohne Expression von Stammzellmarkern auf den Kulturschalen vorhanden sind.



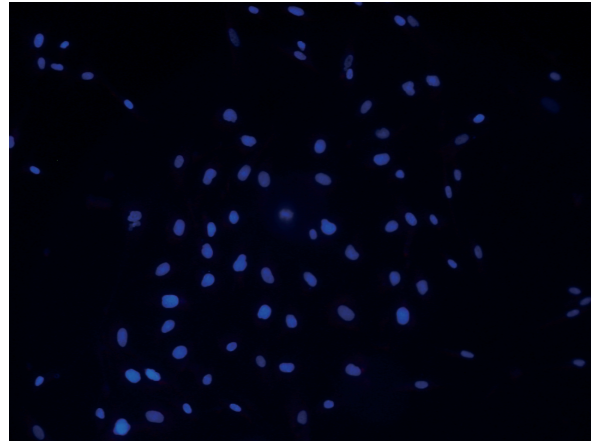
Darst. 57 CFC/CDC Vimentin (rot), HOE (blau)



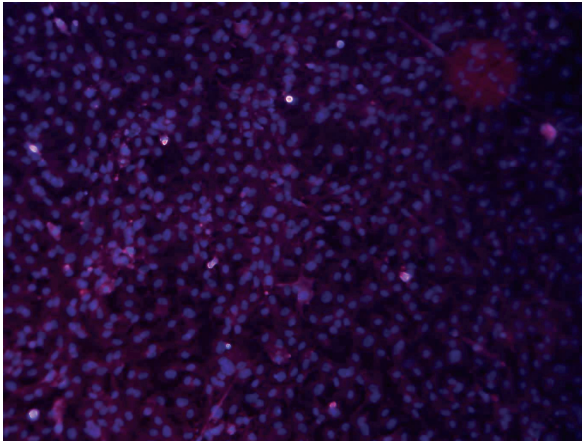
Darst. 58 CFC/CDC vWF schwach positiv (rot), HOE (blau)



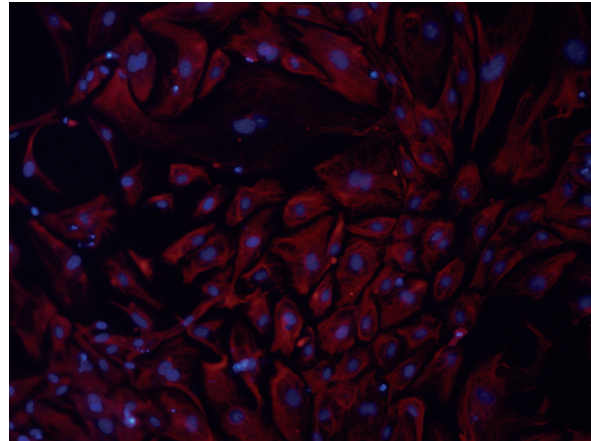
Darst. 59 Dieselbe Zellreihe wie Darst. 58, Vimentin (rot), HOE (blau)



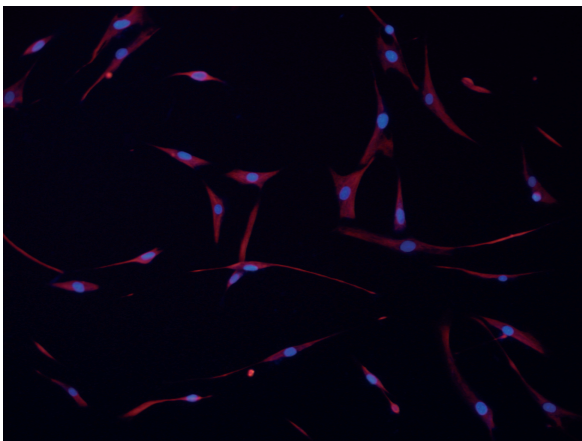
Darst. 60 Dieselbe Zelllinie wie Darst. 58, c-Kit mit Permeabilisierung schwach positiv (rot), HOE (blau)



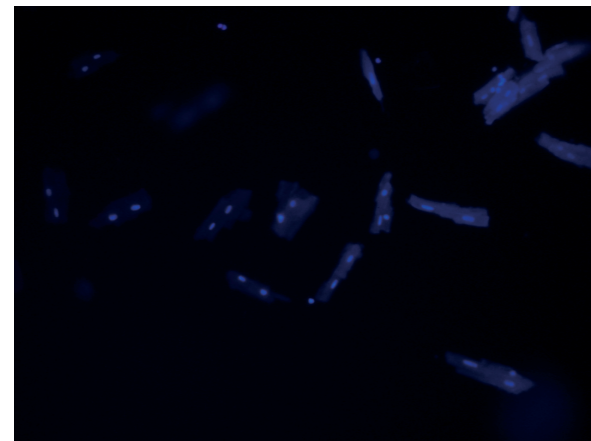
Darst. 61 Endothelzellen Ratte, vWF (rot), HOE (blau)



Darst. 62 humane Endothelzellen, Vimentin (rot), HOE (blau)



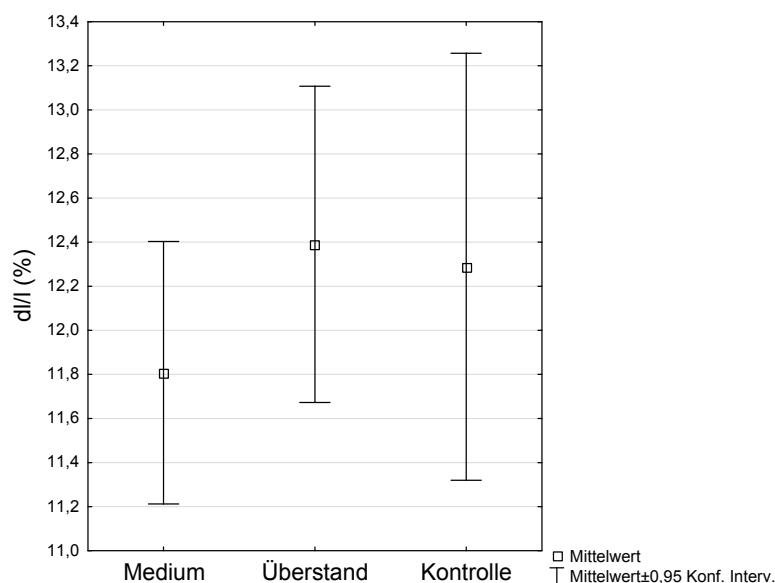
Darst. 63 humane Fibroblasten, Vimentin (rot), HOE (blau)



Darst. 64 ventrikuläre Kardiomyozyten Ratte, Vimentin (nicht sichtbar; rot), HOE (blau)

4.2.5 Zellverkürzungsmessungen – funktionelle Charakterisierung

Die konditionierten Überstände zum Erntezeitpunkt der Zelllinien 1, 4, 35, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 und 45 werden zur Untersuchung der Beeinflussung des Zellverkürzungsverhaltens von isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte eingesetzt. Es wird das Zellverkürzungsverhalten von Kardiomyozyten, die mit dem Überstand und mit dem „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ des letzten Mediumwechsels vor der Ernte stimuliert wurden, untersucht. Als Kontrolle dienen gänzlich unbehandelte Kardiomyozyten. Zu beachten ist hier, dass es keine Gruppenbildung aufgrund der Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien gibt, d.h. dass bei abweichender Zusammenstellung der Zelllinien möglicherweise Unterschiede zu den hier dargestellten Ergebnissen gibt. Die über die magnetische Separierung selektierten Zellreihen (n=2) werden aufgrund der geringen Anzahl nicht dargestellt. Als statistische Einheit wird die Zelllinie betrachtet. Demnach geht lediglich ein Mittelwert pro Bedingung jeder Zelllinie aus den jeweils vorhanden Messungen in die statistische Auswertung ein (n=11 für Medium und Überstand, n=9 für die Kontrolle, das Vergleichssystem ist der Überstand gegen das Medium). Dies geschieht in Anlehnung an die Auswertung der PCR, in der ebenfalls die einzelnen Zelllinien mit einem Wert in das Gesamtergebnis eingehen. Um die Genauigkeit der Zellverkürzungsmessungen zu erhöhen, werden pro Zelle vier Verkürzungen beobachtet und zu einem arithmetischen Mittelwert zusammengefasst.



Darst. 65 Beeinflussung der konditionierten Überstände auf die Zellverkürzung ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte, verbundene Stichproben, n=11 Medium, n=11 Überstand, n=9 Kontrolle, dL/L (%) = relative Zellverkürzung.

Ein positiver Einfluss des Überstandes ist in der Tendenz ersichtlich, allerdings nicht statistisch signifikant. Weitergehende Untersuchungen mit einer Erhöhung der n-Zahl sind notwendig.

4.3 Hypoxieversuche

Um die Wirkung eines hypoxischen Milieus auf die CFC/CDC untersuchen zu können, werden die CFC/CDC, die humanen Fibroblasten und die HUVECs wie beschrieben verschiedenen Hypoxiemodellen unterzogen und für den Western Blot bzw. die PCR geerntet. Außerdem werden die konditionierten Überstände in ihrer Wirkung auf die Zellverkürzung ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte hin untersucht. Zuletzt interessiert noch die Zytokinzusammensetzung ebendieser Überstände vergleichend zwischen Normoxie und Hypoxie.

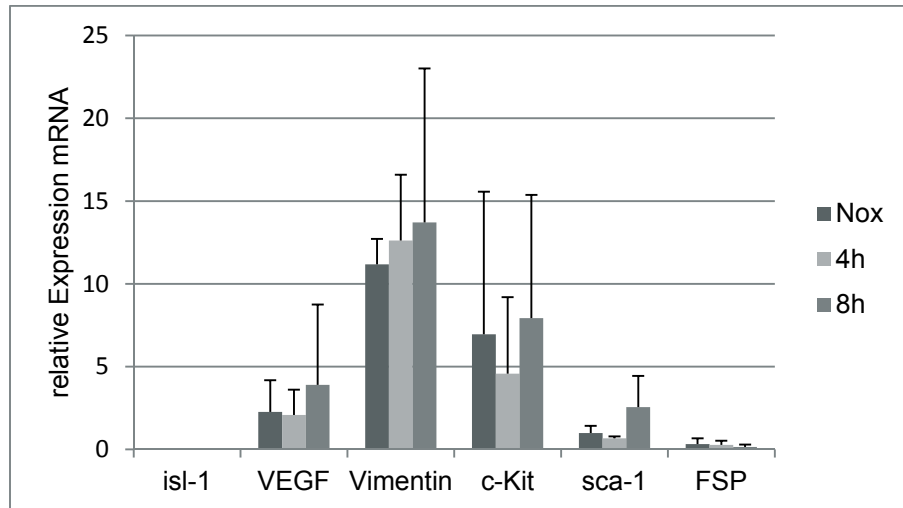
4.3.1 Untersuchung der CFC/CDC auf Transkriptionsebene

Die CFC/CDC werden zum Erntezeitpunkt mit Hilfe dreier verschiedener Hypoxiemodelle untersucht; bis zu diesem Zeitpunkt durchlaufen sie das sechswöchige Kultivierungsprotokoll ohne Modifikationen bei der Trypsinierung, d.h. es werden keine isolierten und neu ausplattierten Kardiosphären oder über Klonierungszylinder bzw. magnetische Separierung selektierte Zellen untersucht. Als Kontrolle gilt der Median der humanen Herzgewebeprobe (in den Graphen nicht dargestellt, entspricht ~1), auf ihn wurde normiert. Welche Zelllinien in den Versuch eingegangen sind, zeigt folgende Übersicht, die Nummerierung entspricht derjenigen aus den bereits beschriebenen Tabellen dieser Arbeit.

A Hypoxie 4h und 8h N₂/CO₂ Gasgemisch	B Hypoxie 4h Gasentwicklungssäckchen	C Hypoxie 6,5h Gasentwicklungssäckchen
Zelllinie Nr. 12	Zelllinie Nr. 18	Zelllinie Nr. 24
Zelllinie Nr. 15	Zelllinie Nr. 19	Zelllinie Nr. 27
Zelllinie Nr. 16	Zelllinie Nr. 20	Zelllinie Nr. 28
	Zelllinie Nr. 22	Zelllinie Nr. 29
	Humane Fibroblasten	Zelllinie Nr. 30
	HUVEC	Zelllinie Nr. 32

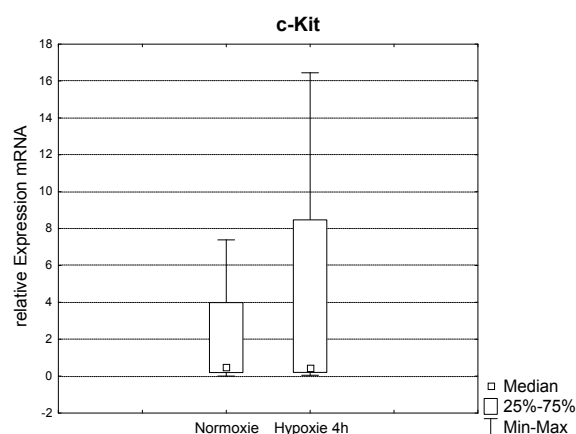
Darst. 66 Übersicht zu den in den Hypoxiemodellen verwendeten Zelllinien

Im Hypoxiemodell A ist in den untersuchten Zelllinien keine Expression des isl-1 nachzuweisen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Marker zwischen Normoxie und Hypoxie.

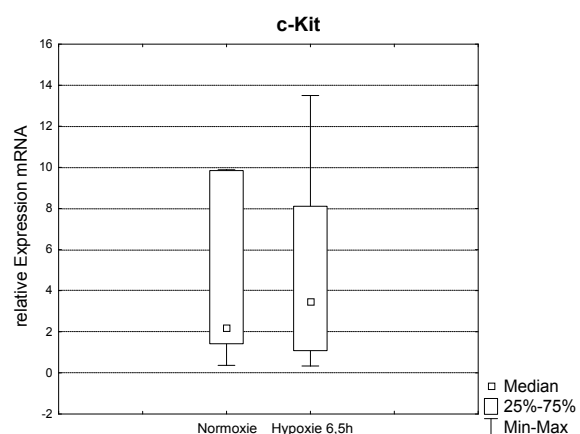


Darst. 67 Hypoxiemodell A, relative mRNA-Expression der untersuchten Marker unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen, Nox = Normoxie, n=3 bzw. bei c-Kit n=2 für Nox, dargestellt ist der Mittelwert, Fehlerindikator trotz geringer n-Zahl als Standardabweichung angegeben

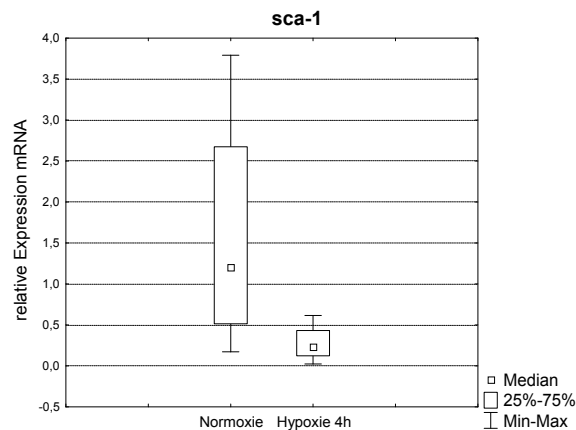
Die Ergebnisse des Versuchsaufbaus B und C sind nachfolgend vergleichend aufgeführt. Ein Einfluss der Hypoxie kann nicht signifikant nachgewiesen werden, dennoch zeigen sich Tendenzen: c-Kit wird bei einer Hypoxiedauer von sechseinhalb Stunden bezogen auf den Median geringfügig hochreguliert, wohingegen sca-1 in beiden Ansätzen herunterreguliert wird. Isl-1 und FSP können als negativ betrachtet werden und werden deshalb nicht dargestellt.



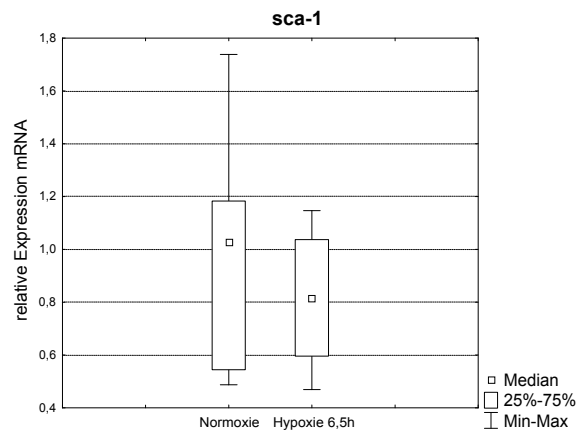
Darst. 68 relative mRNA-Expression von c-Kit in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (4h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).



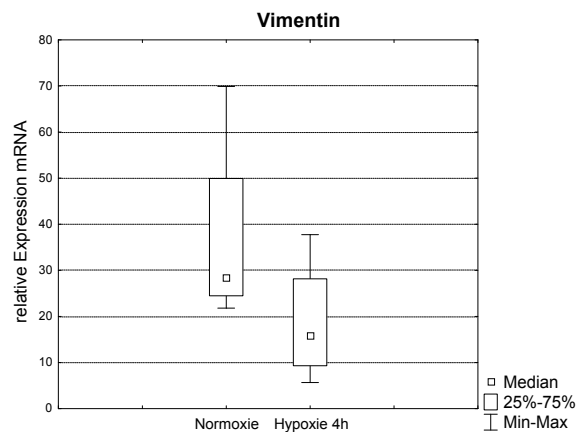
Darst. 69 relative mRNA-Expression von c-Kit in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (6,5h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).



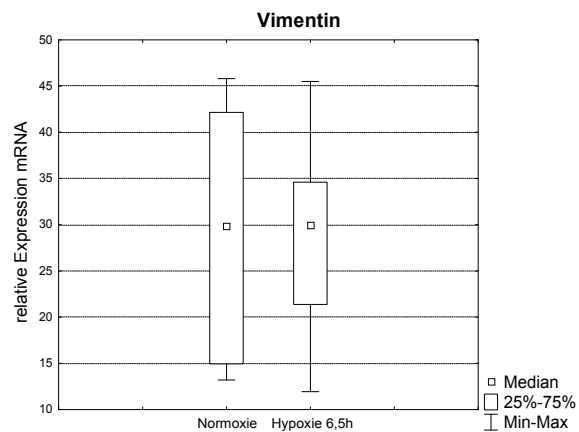
Darst. 70 mRNA- Expression von sca-1 in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (4h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).



Darst. 71 mRNA-Expression von sca-1 in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (6,5h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).

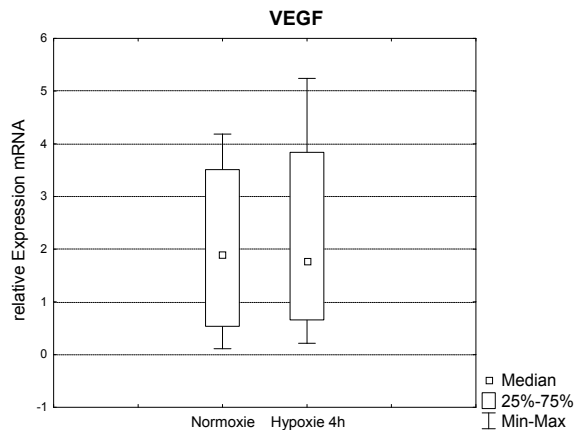


Darst. 72 relative mRNA-Expression von Vimentin in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (4h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).

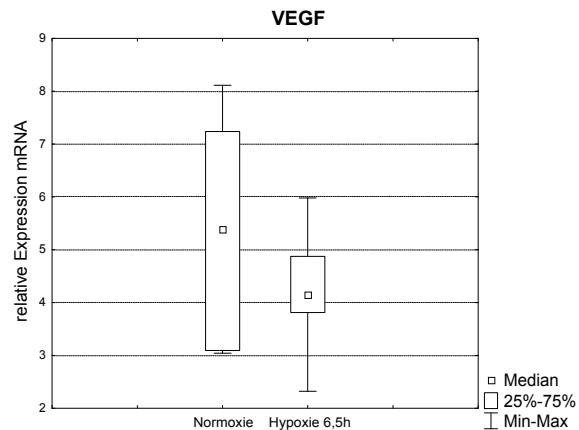


Darst. 73 relative mRNA-Expression von Vimentin in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (6,5h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).

Die Expression des Strukturproteins Vimentin verhält sich konträr innerhalb der verschiedenen Versuchsbedingungen. Bei einer Hypoxiedauer von 4h wird es relativ zum Ganzherz im Trend geringer exprimiert als unter normoxischen Bedingungen, bei einer Hypoxiedauer von sechseinhalb Stunden hingegen ist keine Verminderung der Expression festzustellen. Unter einer vierstündigen Hypoxie lässt sich in den untersuchten Proben keine veränderte Expression des VEGF nachweisen, allerdings erfolgt eine im Trend verminderte Expression bei Ausweitung der Hypoxiedauer. Im Gesamten stellt sich ein inhomogenes Bild bezüglich der untersuchten Marker dar. Eine Herunterregulierung der Stammzellmarker geht nicht zwangsläufig einher mit einer Erhöhung der Strukturmarker bzw. des VEGF als Hinweis auf kompensatorische Mechanismen.

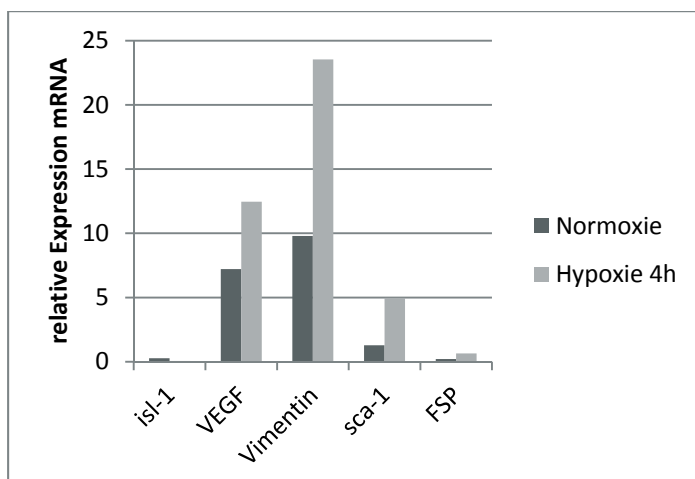


Darst. 74 relative mRNA-Expression von VEGF in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (4h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).

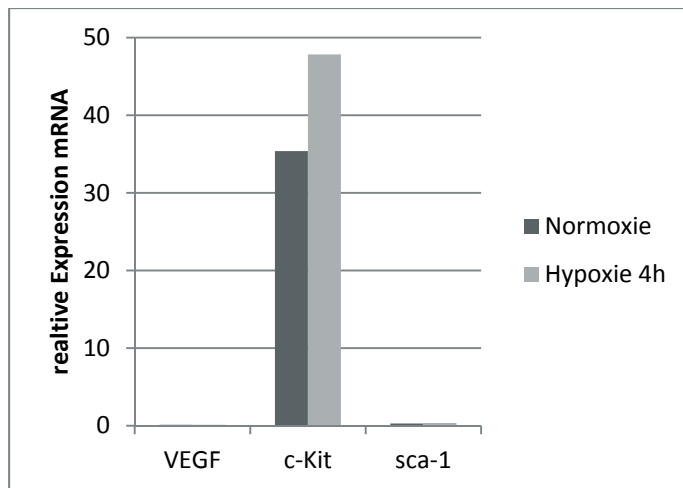


Darst. 75 relative mRNA-Expression von VEGF in Abhängigkeit zur Hypoxiedauer (6,5h) bezogen auf den Median der Kontrolle (nicht dargestellt).

Zusätzlich werden humane Fibroblasten und HUVEC einer vierstündigen Hypoxie nach Versuchsaufbau B unterzogen und aufgearbeitet. Dies dient dem Vergleich dieser Kulturen mit den humanen Primärkulturen bezüglich einer qualitativen Aussage über die Expressionsmuster unter hypoxischen Bedingungen. Die Werte der relativen mRNA-Expression beziehen sich auch hier auf den Median der Ganzherzen als Kontrolle. Unter hypoxischen Bedingungen exprimiert die Kultur der humanen Fibroblasten VEGF, Vimentin und sca-1 im Trend vermehrt; die humanen Endothelzellen hingegen zeigen tendenziell eine erhöhte Expression bei c-Kit. Diese Veränderungen sind naturgemäß statistisch nicht verifiziert; weitere Untersuchungen diesbezüglich sind notwendig.



Darst. 76 relative mRNA-Expression humaner Fibroblasten in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz, nicht dargestellt), verbundene Stichprobe, n=1, deshalb Darstellung nur eines Messwertes.



Darst. 77 relative mRNA-Expression humaner Endothelzellen in Bezug auf die Kontrolle (Ganzherz, nicht dargestellt), verbundene Stichprobe, n=1, deshalb Darstellung nur eines Messwertes.

4.3.2 Untersuchung der Zellverkürzung ventrikulärer Kardiomyozyten

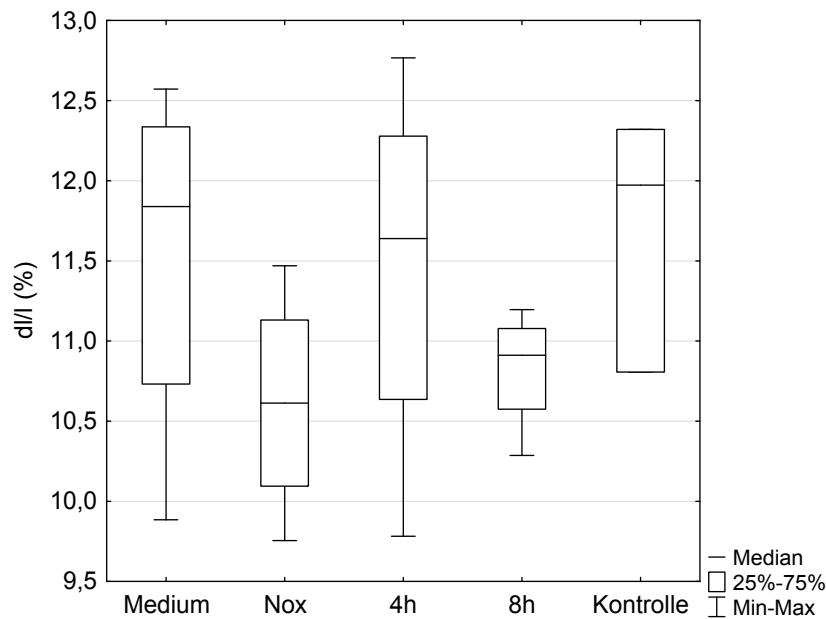
Die in Darstellung 78 aufgeführten Zelllinien werden nach dem bereits beschriebenen Schema einer Hypoxie unterzogen (vgl. Kapitel 4.3.1). Die konditionierten Überstände aus diesen Versuchen werden auf ihren Totalproteingehalt standardisiert und zu isolierten ventrikulären Kardiomyozyten pipettiert, um die relative Zellverkürzung zu bestimmen. Es wird der Einfluss des hypoxischen konditionierten Überstandes im Vergleich zur Normoxie und dem „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ untersucht. Zusätzlich wird eine Kontrolle unbehandelter Kardiomyozyten gemessen. Als statistische Einheit gilt die Zelllinie, es handelt sich hier um abhängige Stichproben.

A Hypoxie 4h und 8h N₂/CO₂ Gasgemisch	B Hypoxie 4h Gasentwicklungssäckchen mit Standardisierung der Proben	C Hypoxie 6,5h Gasentwicklungssäckchen Mit Standardisierung der Proben
Zelllinie Nr. 12	Zelllinie Nr. 18	Zelllinie Nr. 24
Zelllinie Nr. 13	Zelllinie Nr. 19	Zelllinie Nr. 27
Zelllinie Nr. 15	Zelllinie Nr. 20	Zelllinie Nr. 28
Zelllinie Nr. 16	Zelllinie Nr. 22	Zelllinie Nr. 29
	Humane Fibroblasten	Zelllinie Nr. 30
	HUVEC	Zelllinie Nr. 32

Darst. 78 Übersicht zu den Untersuchungen der Zellverkürzung

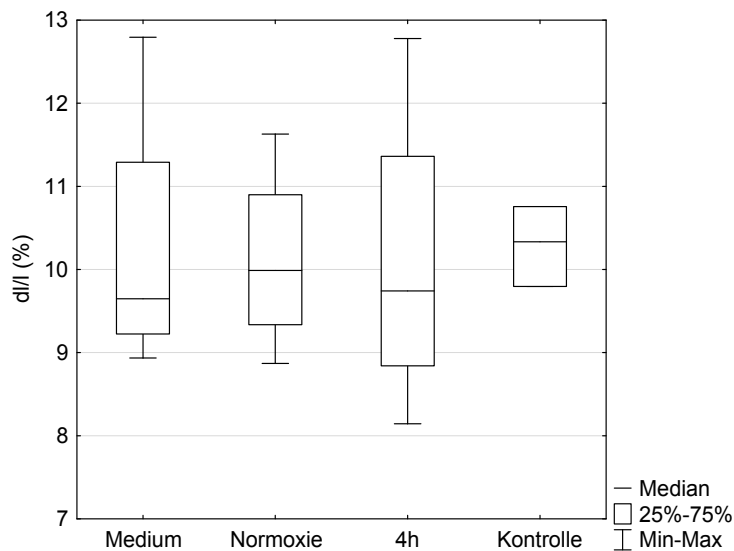
Die Ergebnisse zum Hypoxiemodell A (Darstellung 79) zeigen, dass bei der Untersuchung dieser Zelllinien die relative Zellverkürzung des Mediums im Median nur geringfügig unter der Kontrolle liegt. Außerdem liegt der Median des

normoxischen konditionierten Überstands im Unterschied zu den Ergebnissen der Charakterisierung unter dem des Mediums.



Darst. 79 Zellverkürzungsmessung des Hypoxiemodells A, Nox = Normoxie, 4h = 4h-Gruppe, 8h = 8h-Gruppe, dl/l (%) = relative Zellverkürzung, Kontrolle n=3

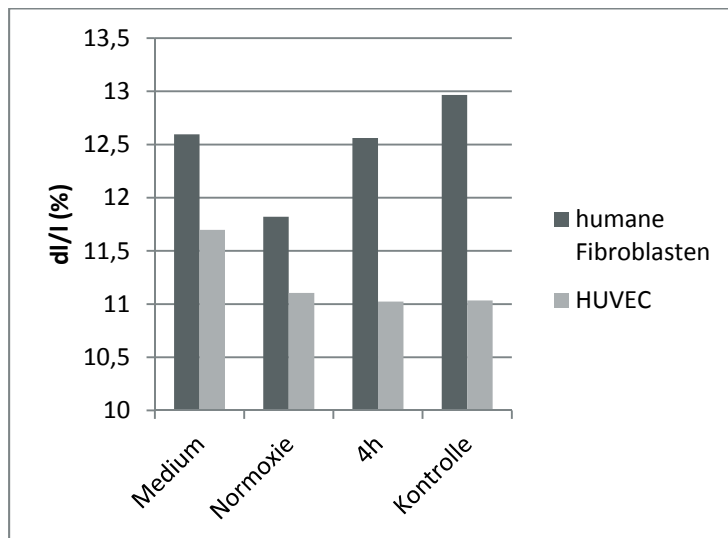
Es lässt sich allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen. Trotzdem zeigt sich nach einer vierstündigen Hypoxie zumindest eine tendenzielle Verbesserung der relativen Zellverkürzung gegenüber der Normoxie.



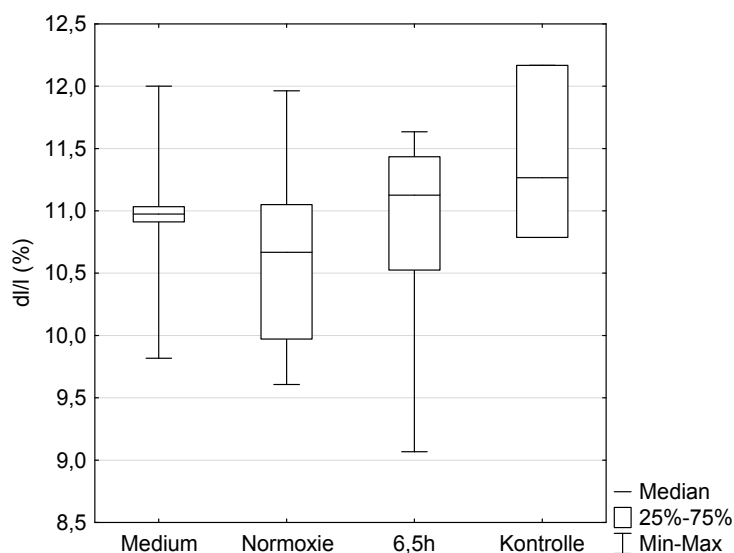
Darst. 80 Zellverkürzungsmessung des Hypoxiemodells B, Nox = Normoxie, 4h = 4h-Gruppe, dl/l (%) = relative Zellverkürzung, Kontrolle n=3

Im Hypoxiemodell B sind die Verhältnisse etwas anders: der Median der Zellverkürzungsmessungen der Normoxie ist höher als der des Mediums. Dieses wiederum liegt im Median nach wie vor unter der Kontrolle. Es können auch in diesem Versuch keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tendentiell erfolgt durch die Hypoxie eine Verminderung der Zellverkürzung. In diesem Hypoxiemodell werden auch humane Fibroblasten und HUVECs exemplarisch untersucht (n=1). Wie aus nachfolgender Graphik ersichtlich, verhält sich der Überstand der Fibroblasten tendenziell entsprechend dem Hypoxiemodell A, d.h. die Hypoxie scheint einen gewissen kompensatorischen Effekt zu haben. Dies kann für die Endothelzellen nicht gezeigt werden.



Darst. 81
Zellverkürzungsmessung der humanen Fibroblasten und der HUVECs, 4h = 4h-Gruppe, dl/l (%) = relative Zellverkürzung, n=1, deshalb Darstellung nur eines Messwertes.



Darst. 82
Zellverkürzungsmessung des Hypoxiemodells C, Nox = Normoxie, 6,5h = 6,5h-Gruppe, dl/l (%) = relative Zellverkürzung, Kontrolle n=3

Die Ergebnisse des Hypoxiemodells C nähern sich denen des Hypoxiemodells A an. D.h. der Median der Normoxie liegt unter dem des Mediums. Der Median des Mediums liegt unter dem der Kontrolle. Die Hypoxie ist tendenziell höher als die Normoxie. Dies könnte ein Resultat der effektiven Hypoxiedauer sein, die in Modell A und C ähnlich sein sollte. Auch hier sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant.

4.3.3 Untersuchung der konditionierten Überstände im Zytokinarray

Nach den bisher geschilderten Ergebnissen stellt sich die Frage, wie die Einflüsse der konditionierten Überstände auf verschiedene Expressionsmuster bzw. auf die Zellverkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten im Vergleich zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen vermittelt werden könnten. Ein möglicher Weg ist die Sekretion verschiedener Zytokine durch die kultivierten CFC/CDC im Sinne eines parakrinen Wirkmechanismus. Die konditionierten Überstände zweier Zelllinien und der humanen Fibroblasten werden folglich auf ihre Zytokinzusammensetzung hin untersucht und Unterschiede zwischen der Normoxie und der Hypoxie als Einzelergebnisse aufgelistet. Untersucht werden die Zelllinien 12 (d.h. Hypoxiemodell A nach 4h), 22 (d.h. Hypoxiemodell B;4h), und die humanen Fibroblasten (Hypoxiemodell B;4h). Der Proteingehalt in diesen Proben variiert. Aus diesem Grunde führt erst eine relative Erhöhung eines Zytokins um das Doppelte bzw. eine Verminderung auf die Hälfte gegenüber der Kontrollmembran zur Nennung des Zytokins in den nachfolgenden Listen. Eine relative Erniedrigung bzw. Erhöhung der Messwerte um das 10fache wird schwarz hervorgehoben, eine relative Erhöhung um das hundertfache und höher wird grau unterlegt dargestellt. Das Vielfache der Erhöhung bzw. Erniedrigung bezieht sich auf das vorliegende relative Messsystem und kann variieren. Das „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ dient als Kontrolle, denn bereits unter normoxischen Bedingungen sind Unterschiede in der Zytokinzusammensetzung gegenüber der Kontrolle (Erhöhung und Verminderung) detektierbar. Da das Hauptaugenmerk allerdings auf dem Einfluss der Hypoxie liegt, wird für dieses Bezugssystem lediglich die Erhöhung der relativen Einheiten um das zehnfache aufgeführt.

Zelllinie Nr.12, Hypoxiemodell A; 4h

Wie aus den nachfolgenden Tabellen ersichtlich, werden sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen Zytokine aus verschiedenen Gruppen (Interleukine, Chemokine usw.) detektiert. Betrachtet man die Ergebnisse der Normoxie gegen das Medium dieser Zelllinie, fällt die hohe Expression der Interleukine auf. Zusätzlich zeigen sich erhöhte Messwerte der Matrixmetalloproteasen und ihrer Gegenspieler (TIMP).

Normoxie vs. Medium - Erhöhung			
Activin C	GRO	IL-19	Pentraxin3 / TSG-14
CCL28 / VIC	IGFBP-2	Latent TGF-beta bp1	Progranulin
Dkk-1	IGFBP-6	LIGHT / TNFSF14	sFRP-3
EDA-A2	IGFBP-rp1 / IGFBP-7	MCP-1	SPARC
Galectin-3	IGF-II R	MIP 2	TIMP-1
GCSF	IL-1 alpha	MMP-1	TIMP-2
GDF-15	IL-6	MMP-10	TIMP-3
Glypican 5	IL-8	NRG3	VEGF
GM-CSF	IL-12 p40	Osteoprotegerin / TNFRSF11B	XEDAR

Darst. 83 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.12, Normoxie vs. Medium (Kontrolle), Messwerte sind relativ um das zehn- (schwarz hervorgehoben) bzw. hundertfache (grau unterlegt) erhöht

Die Hypoxie hingegen wirkt sich lediglich in moderaten Erhöhungen oder Erniedrigungen verschiedener Zytokine aus. Ein markantes Profil lässt sich nicht ableiten.

Hypoxie vs. Normoxie - Erhöhung			
Angiopoietin-2	Frizzled-3	IL-17	Musk
BCMA / TNFRSF17	G-CSF R / CD 114	IL-17B R	NGF R
beta-Defensin 2	GFR alpha-2	IL-17C	NRG1 Isoform GGF2
BIK	GFR alpha-4	IL-17F	Orexin B
BMP-3b / GDF-10	Glucagon	IL-17R	PDGF-AB
BMP-7	Glut1	IL-18 R beta / AcPL	PDGF-C
Cardiotrophin-1 / CT-1	Glut2	IL-20	Persephin
CCL14 / HCC-1 / HCC-3	HB-EGF	IL-21	PIGF
CCR3	HGFR	IL-22 R	RANK / TNFRSF11A
CCR4	HVEM / TNFRSF14	IL-26	RANTES
CCR9	IFN-gamma	IL-27	S100A10
CD40 Ligand / TNFSF5 / CD154	IL-1 F5 / FIL1delta	I-TAC / CXCL11	SAA
Cerberus 1	IL-1 R6 / IL-1 Rrp2	Kremen-2	Siglec-5/CD170
CNTF R alpha	IL-1 R8	Lck	Smad 4
CXCR6	IL-1 R9	Leptin R	TFPI
Epiregulin	IL-1 sRI	Lipocalin-1	TLR3
ErbB2	IL-1 sRII	L-Selectin (CD62L)	TMEFF2
ErbB3	IL-2	Lymphotactin / XCL1	TRAIL R3 / TNFRSF10C
FADD	IL-4	MFRP	TRANCE
FGF Basic	IL-10	MIF	TROY / TNFRSF19
FGF-4	IL-10 R alpha	MIP-1a	VEGF R3
FGF-5	IL-10 R beta	MIP-3 alpha	VEGF-D
FGF-10 / KGF-2	IL-12 p70	MMP-3	WISP-1 / CCN4
FGF-17	IL-12 R beta 1	MMP-8	
FGF-20	IL-15	MMP-13	
Fractalkine	IL-16	MMP-25 / MT6-MMP	

Darst. 84 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.12, Hypoxie vs. Normoxie, Messwerte sind relativ zur Kontrolle um das zwei- bis zehnfache (schwarz hervorgehoben) erhöht.

Hypoxie vs. Normoxie - Verminderung			
AgRP	ENA-78	IL-1 ra	PDGF-BB
Angiopoietin-1	Endocan	IL-3	Pref-1
Angiopoietin-4	Endostatin	IL-3 R alpha	Progranulin
Angiopoietin-like 1	Eotaxin / CCL11	IL-5	P-selectin
Angiopoietin-like 2	Eotaxin-2 / MPIF-2	IL-11	RAGE
APRIL	FAM3B	IL-12 p40	SCF R / CD117
Artemin	FGF R3	IL-17RC	sFRP-1
B7-1 / CD80	FGF-7 / KGF	IL-19	sFRP-3
BAFF R / TNFRSF13C	FGF-9	IL-20 R beta	sgp130
BD-1	FGF-11	Inhibin A	SIGIRR
BDNF	FGF-12	Insulin	Smad 8
beta-Catenin	FGF-16	Insulin R	Sonic Hedgehog (Shh N-terminal)
BLC / BCA-1 / CXCL13	FGF-19	Insulysin / IDE	TGF-alpha
BMP-6	FGF-21	Kininostatin / kininogen	TGF-beta 1
BMP-8	Follistatin	Kremen-1	TGF-beta 3
BMPR-IB / ALK-6	Frizzled-4	LBP	TGF-beta RII
BTC	GASP-1 / WFIKKNRP	Lefty - A	TGF-beta RIII
CCR8	GDF5	LRP-1	Thymopoietin
Chem R23	GDF9	Luciferase	TIMP-4
Csk	Glut3	Lymphotoxin beta /	TL1A / TNFSF15
CLC	Granzyme A	TNFSF3	TLR1
CRIM 1	HCC-4 / CCL16	Lymphotoxin beta R/TNFRSF3	TLR2
Cryptic	HCR / CRAM-A/B	MCP-1	TMEFF1 / Tomoregulin-1
CTACK/CCL27	Hepassocin	MCP-2	TNF-beta
CTLA-4/CD152	Heregulin/NDF/GGF/ Neuregulin	M-CSF	TRAIL / TNFSF10
CV-2 / Crossveinless-2	ICAM-2	MDC	TSLP
CXCL16	IFN-beta	MMP-14	TWEAK / TNFSF12
CXCR3	IGFBP-6	Neuropilin-2	TWEAK R / TNFRSF12
CXCR4 (fusin)	IGF-II	NRG3	uPA
DANCE	IGF-II R	Orexin A	VE-Cadherin
Dkk-4	IL-1 alpha	Osteoactivin / GPNMB	VEGF R2 (KDR)
EGF	IL-1 beta	PD-ECGF	VEGF-C
EGF R / ErbB1	IL-1 F7 / FIL1 zeta	PDGF R alpha	XEDAR

Darst. 85 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.12, Hypoxie vs. Normoxie, Messwerte sind um das zwei- bzw. zehnfache (schwarz hervorgehoben) vermindert gegenüber der normoxischen Kontrolle.

Zelllinie Nr.22, Hypoxiemodell B; 4h

Normoxie vs. Medium - Erhöhung			
BMP-3b / GDF-10	IL-6	MMP-9	
BMP-15	Latent TGF-beta bp1	Pentraxin3 / TSG-14	TIMP-2
IGFBP-3	MCP-1	SPARC	VEGF
IGF-I	MMP-1	TIMP-1	

Darst. 86 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.22, Normoxie vs. Medium (Kontrolle), Messwerte sind relativ um das zehn- (schwarz hervorgehoben) bzw. hundertfache (grau unterlegt) erhöht

Im Vergleich des normoxischen Überstands mit dem Medium (Kontrolle) finden sich deutliche Erhöhungen der Messwerte bei BMP-15, IL-6 und MMP-1. Im Gegensatz hierzu sind in dieser Zelllinie, nachdem die Zellen einer vierstündigen Hypoxie

unterzogen wurden, nur noch moderate Steigerungen verschiedener Zytokine messbar.

Hypoxie vs. Normoxie - Erhöhung			
Angiostatin	Endostatin	IL-22 BP	RANK /
APRIL	ErbB2	Lymphotactin / XCL1	TNFRSF11A
BMP-4	Fas / TNFRSF6	M-CSF	SCF R / CD117
Chordin-Like 1	FGF-7 / KGF	MSP beta-chain	SDF-1 / CXCL12
CXCL14 / BRAK	FGF-16	NAP-2	Siglec-9
CXCR2 / IL-8 RB	GASP-1 / WFIKKRNP	NGF R	TFPI
CXCR4 (fusin)	GM-CSF R alpha	Persephin	Tie-1
D6	HCR / CRAM-A/B	PF4 / CXCL4	TNF RI / TNFRSF1A
EDA-A2	Hepassocin	Pref-1	Ubiquitin+1
EGF	IL-17D	Prolactin	

Darst. 87 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.22, Hypoxie vs. Normoxie, Messwerte sind relativ zur Kontrolle um das zwei- bis zehnfache (schwarz hervorgehoben, grau unterlegt > 100fach) erhöht.

Lediglich EDA-A2 wird deutlich stärker messbar, ansonsten erfolgt i.d.R. eine Verminderung der in der Normoxie detektierten Zytokine. Erstaunlicherweise wird das zuvor induzierte BMP-15 nach der Hypoxie am stärksten herunterreguliert. Eine erneute Erhöhung bereits gesteigerter Zytokine findet sich nicht. Zudem scheint VEGF auch in dieser Messmethode durch eine Hypoxie nicht induziert zu werden, es wird im Gegenteil sogar herunterreguliert. Weiterhin ist ersichtlich, dass das Zytokinprofil beider Zelllinien im Vergleich Normoxie gegen Medium (Kontrolle) voneinander abweicht, dies könnte eine Folge des unterschiedlichen Ausgangsgewebes sein. Betrachtet man die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Hypoxie und Normoxie beider Zelllinien, fällt auf, dass weder bei der Verminderung noch bei der Erhöhung weithin Übereinstimmungen zwischen den Zelllinien zu finden sind. Der Einfluss der Hypoxie äußert sich zwar geringfügig in etwas deutlicheren Erhöhungen einzelner Zytokine der Zelllinie 12, jedoch ist bei Erhöhung und Verminderung der Expression die Beteiligung der Zytokine heterogen oder sogar konträr, d.h. sie werden in der einen Zelllinie vermindert in der anderen jedoch erhöht gemessen. Ursächlich hierfür könnte zum einen erneut das heterogene Ausgangsmaterial, zum zweiten aber auch die unterschiedlichen Hypoxieformen sein.

Hypoxie vs. Normoxie - Verminderung			
Activin B	Frizzled-6	IL-18 R beta / AcPL	Osteoactivin / GPNMB
Activin C	Galectin-3	IL-19	Osteoprotegerin /
Activin RIB / ALK-4	GCSF	IL-20	TNFRSF11B
Angiopoietin-1	G-CSF R / CD 114	IL-20 R alpha	PARC / CCL18
Angiopoietin-like 1	GDF1	IL-23	PDGF-AA
APJ	GDF3	IL-24	PLUNC

AR (Amphiregulin)	GDF8	IL-26	P-selectin
BAFF R / TNFRSF13C	GDF11	IL-27	RAGE
BCMA / TNFRSF17	GDF-15	IL-29	RANTES
beta-Defensin 2	GFR alpha-1	Inhibin A	RELM beta
beta-NGF	GFR alpha-3	Inhibin B	RELT / TNFRSF19L
BIK	GITR / TNFRF18	Insulysin / IDE	ROBO4
BMP-2	GITR Ligand / TNFSF18	I-TAC / CXCL11	SAA
BMP-3b / GDF-10	Glut3	Latent TGF-beta bp1	sFRP-3
BMP-5	Glut5	LBP	sFRP-4
BMP-7	Glypican 5	Lefty - A	SLPI
BMP-15	Growth Hormone (GH)	Leptin R	Smad 1
BMPR-II	Growth Hormone R	Leptin (OB)	Soggy-1
CCR1	(GHR)	LIF	TGF-beta 3
CCR9	HRG-beta 1	LIGHT / TNFSF14	TGF-beta RI / ALK-5
CD14	ICAM-5	Lipocalin-1	TGF-beta RIIb
CD40 / TNFRSF5	IFN-beta	LRP-1	TGF-beta RIII
CD40 Ligand / TNFSF5 / CD154	IFN-gamma	LRP-6	Thrombospondin (TSP)
CD 163	IGFBP-1	Luciferase	Thrombospondin-2
Cerberus 1	IGFBP-2	Lymphotoxin beta /	Thrombospondin-4
Csk	IGFBP-3	TNFSF3	TIMP-2
CNTF R alpha	IGFBP-6	Lymphotoxin beta R /	TIMP-3
Coagulation Factor III/TissueFactor	IGF-I SR	TNFRSF3	TIMP-4
Cripto-1	IGF-II R	MCP-1	TL1A / TNFSF15
CRTN-2	IL-1 alpha	MFG-E8	TLR2
CV-2 / Crossveinless-2	IL-1 F6 / FIL1 epsilon	MFRP	TMEFF1 /
CXCR6	IL-1 F7 / FIL1 zeta	MIF	Tomoregulin-1
Dkk-1	IL-1 F9 / IL-1 H1	MIP-1a	TNF-beta
Dkk-3	IL-1 sRI	MIP-1b	TNF RII / TNFRSF1B
DR3 / TNFRSF25	IL-2 R beta / CD122	MIP-1d	TRADD
EDAR	IL-3	MIP 2	TRAIL R1 / DR4 /
EDG-1	IL-4 R	MIP-3 alpha	TNFRSF10A
EN-RAGE	IL-5	MMP-1	TRAIL R2 / DR5 /
Eotaxin / CCL11	IL-6	MMP-3	TNFRSF10B
Eotaxin-2 / MIPF-2	IL-6 R	MMP-7	TRAIL R3 / TNFRSF10C
ErbB3	IL-7	MMP-8	TSG-6
Erythropoietin	IL-8	MMP-9	TWEAK / TNFSF12
Endothelin	IL-9	MMP-11	uPAR
FADD	IL-10 R alpha	/Stromelysin-3	Vasorin
FAM3B	IL-12 R beta 1	MMP-16 / MT3-MMP	VE-Cadherin
Fas Ligand	IL-13 R alpha 1	MMP-20	VEGF
FGF-BP	IL-15	MMP-24 / MT5-MMP	VEGF R2 (KDR)
FGF R5	IL-15 R alpha	Neuropilin-2	VEGF R3
FGF-4	IL-16	Neurturin	VEGF-B
FGF-21	IL-17B R	NRG2	VEGF-D
FGF-23	IL-17E	NRG3	WIF-1
Flt-3 Ligand	IL-17F	NT-3	WISP-1 / CCN4
Follistatin	IL-17RC	NT-4	
Frizzled-4	IL-17RD	Orexin B	
Frizzled-5	IL-18 BPalpha	OSM	

Darst. 88 Übersicht Zytokine Zelllinie Nr.22, Hypoxie vs. Normoxie, Messwerte sind um das zwei- bzw. zehnfache (schwarz hervorgehoben; grau unterlegt > 100fach) vermindert gegenüber der normoxischen Kontrolle.

Humane Fibroblasten; Hypoxiemodell B; 4h

Zum Vergleich der Expressionsmuster zwischen den CFC/CDC und Fibroblasten wird eine Kultur humaner Fibroblasten der Lunge ebenfalls unter hypoxische Bedingungen gebracht und nach der Ernte auf die Zytokinexpression hin untersucht. Als Kontrolle dient wiederum das „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ (hier der Zelllinie 22).

Normoxie vs. Medium - Erhöhung			
Activin A	IL-6	MMP-3	VEGF
GCSF	IL-8	TIMP-1	
GDF-15	MMP-1	TIMP-2	

Darst. 89 Übersicht Zytokine humane Fibroblasten, Normoxie vs. Medium, Messwerte sind um das zehnfache (schwarz hervorgehoben) bzw. hundertfache (grau unterlegt) erhöht.

Die Überstände der Normoxie zeigen in der relativen Erhöhung um den Faktor 100 ein ähnliches Zytokinprofil wie die normoxischen Überstände der CFC/CDC. Auch hier sind Zytokine unterschiedlicher Gruppen nachweisbar. Betrachtet man allerdings die Ergebnisse der Messung der hypoxischen Überstände gegen die Normoxie, zeigt sich einmal mehr ein heterogenes Bild mit deutlichem Nachweis der Interleukine und Metalloproteinasen. Gleichbleibend ist der geringe Einfluss der Hypoxie auf die Zytokinexpression im Vergleich zur Normoxie.

Hypoxie vs. Normoxie - Erhöhung			
Activin RII A/B	FGF-10 / KGF-2	IL-17	NRG2
Activin RIIA	FGF-18	IL-17RD	NRG3
AgRP	Flt-3 Ligand	IL-19	NT-3
Angiogenin	Frizzled-1	IL-20 R alpha	Orexin A
Angiopoietin-1	Galectin-3	IL-29	PD-ECGF
BCMA / TNFRSF17	GFR alpha-3	Inhibin B	PDGF-AA
BMP-3b / GDF-10	Glut1	LBP	PDGF-C
Cardiotrophin-1 / CT-1	GM-CSF R alpha	Leptin R	PECAM-1 / CD31
CD30 Ligand / TNFSF8	Growth Hormone R (GHR)	LIF	RELT / TNFRSF19L
CXCL14 / BRAK	HB-EGF	Luciferase	SAA
CXCL16	Hepassocin	Lymphotactin / XCL1	SLPI
CXCR5 / BLR-1	HGFR	MCP-1	TACI / TNFRSF13B
Decorin	HVEM / TNFRSF14	MCP-2	TGF-beta RI / ALK-5
Dkk-1	IFN-beta	M-CSF	TGF-beta RIII
EDG-1	IGFBP-4	MMP-7	TL1A / TNFSF15
Endocan	IGF-I SR	MMP-9	TMEFF1 / Tomoregulin-1
EN-RAGE	IL-1 R6 / IL-1 Rrp2	MMP-13	TRADD
Eotaxin-3 / CCL26	IL-1 R9	MMP-15	TRAIL / TNFSF10
E-Selectin	IL-7	MMP-19	TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A
Endothelin	IL-10 R beta	MMP-20	TRAIL R3 / TNFRSF10C
Fas / TNFRSF6	IL-11	Musk	uPAR
FGF R4	IL-12 p70	MSP beta-chain	VE-Cadherin

FGF-6	IL-12 R beta 1	Neuritin
FGF-8	IL-16	Neurturin

Darst. 90 Übersicht Zytokine Zelllinie humane Fibroblasten, Hypoxie vs. Normoxie, Messwerte sind relativ zur Kontrolle um das zwei- bis zehnfache (schwarz hervorgehoben) erhöht.

Hypoxie vs. Normoxie - Verminderung			
Fractalkine	IGF-I	Lipocalin-1	TLR1
GCSF	IL-1 alpha	MMP-16 / MT3-MMP	TREM-1
Glypican 5	IL-17B	Orexin B	TWEAK R / TNFRSF12
IGFBP-1	IL-26	S100A10	Ubiquitin+1

Darst. 91 Übersicht Zytokine Zelllinie humane Fibroblasten, Hypoxie vs. Normoxie, Messwerte sind um das zwei-bzw. zehnfache (schwarz hervorgehoben) vermindert gegenüber der normoxischen Kontrolle.

5. Diskussion

In dieser Studie wird gezeigt, dass die aus einer Primärkultur des Herzens gewonnenen Zellen sehr variabel und in ihrem regenerativen Potential nicht eindeutig zu charakterisieren sind. Gleichwohl gibt es sowohl auf morphologischer als auch auf der Ebene der Transkription Hinweise auf Stammzeleigenschaften der angezüchteten Zellen. Welcher Zellpopulation diese zuzuschreiben sind, bleibt aber fraglich. Ungeachtet dieser Schwierigkeiten zeigt sich zumindest tendentiell ein positiver Einfluss auf die Funktion isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten, insbesondere nach einer Hypoxie, wie sie in Anlehnung an ein Infarktgeschehen simuliert wurde.

5.1 Beurteilung der Kultivierungsverfahren

Beruft man sich auf die in der Einleitung erwähnte Definition der kardialen Progenitorzellen als eigenständige neue Zellpopulation im Herzen, so zeigt diese Studie, dass es zwar mit der hier beschriebenen Durchführung der Kultivierung und insbesondere der Trypsinierung nicht möglich ist, diese Population gesondert anzusprechen, ihre Existenz aber auch nicht widerlegt ist. Unklar bleibt, zu welchem Zeitpunkt eine mögliche Differenzierung in Richtung Endothelzellen, Fibroblasten oder Kardiomyozyten induziert wird (hierbei spielen nicht nur die vorhandenen Zellpopulationen eine Rolle, sondern auch die Anzahl der Passagen, die Dichte der Zellen und die Zusammensetzung der Medien)¹¹¹, denn Zellen unterschiedlicher Morphologie sind schon relativ früh (fibroblastenartige Zelle bereits einen Tag nach Beginn der Kultivierung, endothelzellartige nach ca. elf Tagen) und sowohl vor als auch nach Trypsinierung und Medienwechsel nachweisbar. Ob es sich hierbei um adulte Zellen des kultivierten Gewebes handelt oder um bereits in diesem Stadium in Richtung Endothelzellen und Fibroblasten differenzierte Vorläuferzellen ist nicht zu beantworten. Gegen letzteres spricht die Tatsache, dass diese Zelle parallel zu den beschriebenen „phase bright cells“ und den Kardiosphären und unabhängig von den äußeren Bedingungen entstehen. Die angelegten Kulturen humaner Fibroblasten bzw. humaner Endothelzellen dienen unter der gebotenen Vorsicht aufgrund des Ursprungs aus anderen Organen als dem Herzen dem morphologischen Vergleich

¹¹¹ Vgl. Freshney, R. I., Culture of, 2010.

und zeigen deutliche Ähnlichkeiten (spindelförmiges Wachstum, Bildung des Kopfsteinpflastermusters u.a.) zu den Primärkulturen. Als Folge müssen die beobachteten Effekte einer undefinierten und zudem je nach Ausgangsmaterial heterogenen Mischkultur verschiedener Zellpopulationen zugeschrieben werden.

Die Trypsinierung, wie sie hier durchgeführt wurde, ist mit Ausnahme der magnetischen Separierung kein selektiver Prozess, vielmehr wird eine Passage des vorhandenen Zellmaterials mit anschließendem Wechsel zu einem angereicherten Medium durchgeführt. Dies erklärt die wenig abweichende Morphologie der fibroblastenartigen Zellen, die zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung nachweisbar sind. Verschiedene Studien, die sich mit der Kultivierung von Primärkulturen des Herzens beschäftigt haben, beschreiben ebenfalls das Auftreten fibroblastenartiger Zellen, über welchen runde „phase-bright cells“ migrieren.¹¹² Diese erscheinen allerdings deutlich kleiner als die hier zunächst beobachteten runden Zellen mit hohem Kern-Zytoplasmaverhältnis und dünnem Zytoplasmasaum, welche man bereits nach wenigen Tagen erkennen kann. Hughes beschreibt ebensolche Zellen und bezeichnet sie als „primitive Zellen“.¹¹³ Ob es sich bei diesen Zellen nun um die gesuchte Stammzell-/Progenitorzellpopulation handelt und sie somit gleichzusetzen sind mit den „phase bright cells“, bleibt fraglich, denn gleichzeitig stellt sich die Frage nach möglichen Kontaminationen durch Mastzellen/Monozyten und dem weiterhin fehlenden Nachweis des regenerativen Potentials.¹¹⁴

Der Versuch über eine magnetische Separierung mit den in der hier vorliegenden Studie verwendeten Antikörpern eine Selektion der gesuchten Zellen durchzuführen, muss in dem hier verwendeten System als wenig geeignet betrachtet werden, um Zellen, die c-Kit und sca-1 positiv sind, so anzureichern, dass die anschließenden Untersuchungen im Western Blot positiv verlaufen. Dies schließt jedoch nicht aus, dass Zellen mit einem regenerativen Potential auf den Kulturschalen vorhanden sind. Ein weiterer Hinweis hierauf sind die Kardiosphären. Sie bilden sich nahezu ausschließlich in den humanen Primärkulturen des Herzens und hier sowohl auf Poly-L-Lysin als auch auf Poly-D-Lysin beschichteten Kulturschalen, nicht aber in

¹¹² Vgl. Hughes, S., Cardiac stem, 2002, S. 468–478; vgl. dazu auch Messina, E. et al., Isolation and, 2004, S. 911–921.

¹¹³ Vgl. Hughes, S., Cardiac stem, 2002, S. 468–478.

¹¹⁴ Vgl. Pouly, J. et al., Cardiac stem, 2008, S. 673–678; vgl. dazu auch Minuth, W. W., Von der Zellkultur, 2002.

den Kulturen der humanen Fibroblasten oder der Endothelzellen, was für eine Wechselwirkung verschiedener Populationen sprechen könnte. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der gebildeten Kardiosphären und den verschiedenen Bedingungen ist bei der Kultivierung nicht aufgefallen und aufgrund der hohen Variabilität des Ausgangsmaterials schwierig zu zeigen. Das erneute Ausplattieren der Kardiosphären könnte als weiterer Selektionsprozess betrachtet werden. Wie groß das regenerative Potential der hieraus wachsenden Zellen ist und welche Zellpopulationen beteiligt sind, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Zur Bedeutung und zum Aufbau der Kardiosphären lässt sich folgendes sagen: Laut Messina et al. können sowohl Stammzell- (d.h. c-Kit) als auch Endothelzellmarker nachgewiesen werden.¹¹⁵ Davis et al. konkretisieren dies insofern, als dass sich die c-Kit positiven Zellen im Kern der Kardiosphäre und mesenchymale Zellen in der Peripherie befinden. Die Funktion der Kardiosphären sehen diese und andere Autoren in der Bereitstellung eines Mikromilieus, welches dem einer Nische im Herzen entsprechen könnte und somit die Ausprägung von Stammzeleigenschaften begünstigt.¹¹⁶ Diese Zusammensetzung lässt sich zwar in der Immunfluoreszenz in dieser Studie nicht bestätigen, da sich kein positiver Nachweis für c-Kit findet und dies der kritischen Betrachtung von Andersen et al. entspricht¹¹⁷, dennoch könnten die hauptsächliche Bildung der Kardiosphären in Primärkulturen des Herzens (es findet keine Kardiosphärenbildung in Fibroblastenkulturen statt) und der positive Nachweis für Stammzellmarker in CFC/CDCs in der PCR zumindest Hinweise auf die Existenz von Zellen mit erweitertem Potential, ungeachtet ihrer Herkunft und ihrer eigentlichen Charakterisierung, sein.

Entsprechend offener lässt sich die Definition einer kardialen Progenitorzelle treffen. Spricht man allgemeiner und enger angelehnt an die eigentliche Wortbedeutung von „Progenitorzelle“, so lassen sich die hier kultivierten Zellen in ihrer Gesamtheit als Vorläuferzellen unklarer Differenzierung definieren. Über den Ursprung dieser Zellen wird so keine Aussage getroffen und es bleibt offen, um welche Zellpopulation genau es sich handelt. Demnach wären auch Fibroblasten bzw. fibroblastenartige Zellen als Progenitorzellen anzusprechen, allerdings ist mit dieser Definition über ihr Potential

¹¹⁵ Vgl. Messina, E. et al., Isolation and, 2004, S. 911–921; vgl. dazu auch Barile, L. et al., Endogenous cardiac, 2007, S. 31–48.

¹¹⁶ Vgl. Davis, D. R. et al., Validation of, 2009, S. e7195; vgl. dazu auch Aghila Rani, K. G. et al., Isolation of, 2008, S. 50–56.

¹¹⁷ Vgl. Andersen, D. C. et al., Murine cardiospheres, 2009, S. 1571–1581.

und ihre Abgrenzung zu adulten Zellen nichts ausgesagt. Um diesem Umstand gerecht zu werden, werden die Begriffe CFC und CDC verwendet. Sie sollen in dieser Studie die gesamte Zellpopulation, welche zur Bildung einer Kardiosphäre führt bzw. die sich aus den Kardiosphären entwickeln kann (inklusive fibroblastenartiger Zellen) beschreiben. Der positive Einfluss der konditionierten Überstände aus den hier angelegten Kulturen (die zweifelsfrei Mischkulturen sind), widerspricht dieser Darstellung nicht, gibt es doch diverse Untersuchungen zur parakrinen Wirkung von Fibroblasten und Endothelzellen.¹¹⁸ Wie hoch der Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den hier aufgezeigten Einflüssen auf die Zytokinsekretion bzw. die Verkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten ist, kann nicht definiert werden.

5.2 Beurteilung der Charakterisierung

Die Charakterisierung der verwendeten Zellen über Western Blot, Immunfluoreszenz, PCR und Messung der Zellverkürzung liefert ein konträres Bild. Zum einen lässt sich sagen, dass ein Nachweis auf Proteinebene über Stammzeleigenschaften der verwendeten Zellen nicht gelungen ist, hingegen der Nachweis von Vimentin und GATA4 funktioniert. Vimentin ist ein Hinweis auf Zellen mesenchymalen Ursprungs, eine Unterscheidung in Fibroblasten und/oder Endothelzellen allein aufgrund dieses Markers ist allerdings nicht möglich. Auch kann keinerlei Rückschluss auf das Entwicklungspotential dieser Zellen gezogen werden. GATA4 gilt als embryonaler Transkriptionsfaktor kardialen Gewebes, er wird aber auch in Fibroblasten exprimiert¹¹⁹, so dass sowohl der Nachweis von Vimentin als auch von GATA4 kongruent zu den Ergebnissen aus den Kultivierungsverfahren sind: es liegt eine Mischkultur vor.¹²⁰

Die Immunfluoreszenz unterstützt ebendieses Ergebnis: auch hier lässt sich insbesondere Vimentin nachweisen, wohingegen c-Kit z.B. in den Kardiosphären nicht sichtbar wird. Dies sollte aber der Fall sein, wenn man den Darstellungen im vorigen Kapitel zur möglichen Funktion der Kardiosphären folgt. Der fragliche

¹¹⁸ Vgl. *Camelliti, P. et al.*, Structural and, 2005, S. 40–51; vgl. dazu auch *Ottaviano, F. G. et al.*, Communication signals, 2011, S. 513–521; vgl. dazu auch *Kakkar, R. et al.*, Intramyocardial fibroblast, 2010, S. 47–57; vgl. dazu auch *Shah, A. M.*, Paracrine modulation, 1996, S. 847–867; vgl. dazu auch *Nilsen, E. M. et al.*, Cytokine profiles, 1998, S. 635–642.

¹¹⁹ Vgl. *Zaglia, T. et al.*, Cardiac interstitial, 2009, S. 653–662.

¹²⁰ Vgl. *Molkentin, J. D. et al.*, Requirement of, 1997, S. 1061–1072; vgl. dazu auch *Zaglia, T. et al.*, Cardiac interstitial, 2009, S. 653–662.

Nachweis von vWF in den CFC/CDC kann nicht eindeutig einer Differenzierungsleistung möglicher Stamm-/Progenitorzellen zugeschrieben werden, denn eine Entscheidung darüber, ob es sich um adulte Zellen oder differenzierte Progenitorzellen handelt, ist nicht zu treffen. Zudem konnte der Nachweis nicht reproduziert werden. Bestätigend beschreibt eine Untersuchung von Davis et al. den Auswuchs in Primärkulturen ebenfalls als gemischte Zellpopulationen. Hinweise auf eine kardiale Differenzierung konnten bereits 2009 gezeigt werden. In der von mir durchgeführten Studie konnten diese Ergebnisse nicht erzielt werden. Mögliche Gründe hierfür könnten die bereits erwähnten Unterschiede im Ausgangsmaterial oder die Kultivierungsmethode sein.¹²¹

Die PCR-Ergebnisse sind insofern interessant, als dass hier Stammzellmarker sowohl in humanen Herzgewebeproben als auch zu den Zeitpunkten Trypsinierung und Ernte nachweisbar sind. Die Erhöhung des Markers c-Kit in den Stichproben zum Trypsinierungszeitpunkt entspricht Untersuchungen von Davis et al., nach welchen der Anteil der c-Kit positiven Zellen der Ratte nach drei Wochen Kultivierung am höchsten war.¹²² Der uneinheitliche Nachweis der Expression von Stammzellmarkern im Ganzherzen und in der Zellkultur gibt Anlass zu Spekulationen: so gibt es z.B. die Studie von Pouly et al., nach der die Anzahl der c-Kit positiven Zellen in Kultur sehr gering ist und sie zudem als Mastzellen identifiziert wurden.¹²³ Hinzu kommt, dass die untersuchten Marker nicht nur auf Stammzellen exprimiert werden.¹²⁴ In dieser Studie muss zudem berücksichtigt werden, dass die Proben sehr heterogen sind, was die hohe Streuung erklären könnte. Dennoch werden insbesondere die Ergebnisse der abhängigen Stichproben als Hinweis auf die Existenz von Zellen mit erweitertem Potential gewertet, unabhängig davon, ob es sich hierbei um kardiale Progenitorzellen oder Zellen anderen Ursprungs handelt. Spekulativ könnte eine verminderte Expression von Stammzellmarkern hin zu mesenchymalen Markern ein Hinweis auf eine partielle Differenzierung der Zellen sein.

¹²¹ Vgl. Davis, D. R. et al., Validation of, 2009, S. e7195; vgl. dazu auch Maxeiner, H. et al., New insights, 2010, S. 730-737.

¹²² Vgl. Davis, D. R. et al., Isolation and, 2010, S. 312–321.

¹²³ Vgl. Pouly, J. et al., Cardiac stem, 2008, S. 673–678.

¹²⁴ Vgl. Anversa, P. et al., Myocyte renewal, 2002, S. 240–243.

Die Ergebnisse zu den Markern mesenchymaler Zellen (Vimentin, FSP) sind konträr, gleichwohl sie sowohl zum Trypsinierungs- als auch zum Erntezeitpunkt nachweisbar sind: Die Expression von Vimentin ist im Ganzherzen am niedrigsten, von FSP hingegen am höchsten. Wodurch dies bedingt ist, lässt sich so nicht sagen, allerdings entspricht der Nachweis zum Trypsinierungs- und Erntezeitpunkt der Feststellung, dass sich eine Mischkultur auf den Schalen befindet. Als Ausdruck einer basalen Expression ohne Stimulus durch eine Hypoxie wird die nahezu konstante Expression von VEGF gewertet.

Neben der Diskussion um die geeigneten Marker zur Identifizierung kardialer Progenitorzellen im engeren Sinne, bleibt die Frage des Entwicklungspotentials nach Stimulation, wie hier exemplarisch über 5-Azacidin durchgeführt. Eine Progenitorzellpopulation sollte in der Lage sein, zu differenzieren und dies im Falle der Differenzierung zu Kardiomyozyten z.B. in einer erhöhten Expression von Proteinen des kontraktiles Apparates oder noch weitergehend in der Ausbildung einer Sarkomerstruktur zeigen. Das Fehlen dieser Nachweise könnte zum einen in ungeeigneten Umgebungsmilieus begründet zum anderen aber auch Ausdruck fehlenden Entwicklungspotentials sein. Zudem zeigt sich, dass wiederum Vimentin in dieser Kultur nachweisbar ist, so dass dies den hohen Anteil mesenchymaler Zellen bestätigt. Die Erhöhung der Vimentinexpression nach Stimulierung mit 5-Azacidin kann nicht eindeutig erklärt werden, da dies, bedingt durch den exemplarischen Versuchsaufbau, zufällig geschehen sein könnte. Zudem lässt sich nicht sagen, ob die Erhöhung in einer Differenzierung kardialer Progenitorzellen im engeren Sinne begründet, oder Ausdruck eines Umbauprozesses aller auf den Schalen wachsender Zellen ist.

Die Beurteilung der funktionellen Eigenschaften der CFC/CDC ergibt folgendes Bild: Stellt man die Ergebnisse des „Zellkulturmediums nach Trypsinierung“ einer reinen Kontrolle und den konditionierten Überständen gegenüber, ergibt sich in den hier untersuchten Zelllinien eine tendenzielle Verbesserung auf das Zellverkürzungsverhalten der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten durch den konditionierten Überstand. Leider konnte in dem hier gewählten Auswertungsverfahren keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Möglicherweise sezernieren die CFC/CDC dieser Kulturen dennoch parakrine

Faktoren, welche diese tendenzielle Verbesserung zur Folge haben können. Der zu Grunde liegende Mechanismus könnte über ein verbessertes Kalziumhandling (SERCA/NCX-Verhältnis) vermittelt werden.¹²⁵ Andere Optionen wären die Beeinflussung der an der Kontraktion beteiligten Proteine (z.B. Troponin) oder die Induktion verschiedener Gene in den Kardiomyozyten. Bei letzterem ist allerdings zu berücksichtigen, dass der Effekt innerhalb von 24 Stunden erreicht sein müsste, da dies der Dauer der Stimulation der Kardiomyozyten mit den konditionierten Überständen bzw. dem Medium entspricht.

Es muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass nicht alle Zelllinien diesen tendenziellen positiven Effekt im normoxischen konditionierten Überstand gegenüber dem Medium aufweisen. Gründe für diese Abweichung können die statistische Auswertungsmethode, das unterschiedliche Ausgangsmaterial oder methodische Fehler sein. Letzteres insofern, als dass das Verfahren der Standardisierung der verwendeten Überstände diskutabel ist: wurden für die funktionelle Charakterisierung gleiche Volumina unabhängig von der tatsächlichen Zellzahl bzw. des Totalproteingehaltes verwendet, so folgt in den Hypoxieversuchen (Modell B und C) eine Standardisierung auf den gemessenen Totalproteingehalt. Nur bei gleicher Zellzahl und angenommenem gleichen Proteingehalt lässt sich im ersten Ansatz erschließen, welche Zelllinie „wirkungsvollere“ Substanzen sezerniert. Problematisch ist dieser Ansatz allerdings insofern, als dass die Zellzahl zu dem Zeitpunkt nicht standardisiert ist und die Zusammensetzung der Zellen unklar bleibt. Es kann also kein Rückschluss auf einen höheren Anteil an potenten kardialen Progenitorzellen gezogen werden. Zudem ist die tatsächlich sezernierte Proteinmenge (respektive Zytokinmenge) nicht vorhersehbar. D.h. selbst bei exakter Übereinstimmung der Zellzahl folgt nicht automatisch die Sezernierung der gleichen Zytokinmenge. Eine Normierung der konditionierten Überstände auf die Zellzahl birgt somit das Risiko ungleiche Proteinmengen/Zytokinmengen auf die ventrikulären Kardiomyozyten zu geben. Die gemessene Verbesserung der Zellverkürzung könnte also z.B. auf einer höheren Menge und nicht auf wirksameren Zytokinen beruhen. Bei der Standardisierung auf den Totalproteingehalt geht man zwar diesen Schwierigkeiten aus dem Weg, allerdings bleibt die Frage, inwiefern der Totalproteingehalt tatsächlich repräsentativ für die sezernierte Zytokinmenge ist und ob somit ein adäquates Aliquot

¹²⁵ Vgl. Maxeiner, H. et al., New insights, 2010, S. 730–737.

ausgewählt wird. Mögliche potente Zytokine könnten aufgrund falsch hoher Messwerte des Totalproteins in zu niedriger Konzentration vorliegen. Bei beiden Methoden bleibt offen, ob die Effekte tatsächlich durch Zytokine oder doch durch andere Proteine (die Überstände enthalten FCS) verursacht werden. Unterschiede in der Zellverkürzung bedingt durch das Medium könnten auf unterschiedliche Zusammensetzungen des enthaltenen FCS zurückzuführen sein.

Demnach bleibt abschließend zu sagen, dass ein Beweis für die Existenz von kardialen Progenitorzellen im engeren Sinne nicht erbracht ist, gleichzeitig aber das tatsächliche Entwicklungspotential der hier vorliegenden Zellen und die Zusammensetzung der Kultur kritisch zu hinterfragen sind.

5.3 Beurteilung der Hypoxieversuche

PCR

Wie bereits ausführlich beschrieben, wurden drei unterschiedliche Hypoxiemodelle gewählt. Bei ihrer Beurteilung muss zwischen den strukturellen und den funktionellen Untersuchungen unterschieden werden. Als Kontrolle dienen die Herzgewebeproben. Beginnend mit den strukturellen Unterschieden lässt sich sagen, dass in allen Modellen keine signifikanten Unterschiede in den Expressionen der untersuchten Marker zu finden sind. Es kann lediglich eine Tendenz beschrieben werden, eine Interpretation bleibt spekulativ: In den Modellen B und C wird Sca-1 herunterreguliert, c-Kit bei sechseinhalbstündiger Hypoxie geringgradig herauf, wobei gleichzeitig Strukturmarker mit zunehmender Hypoxiedauer konstant bleiben: Möglicherweise induziert die Hypoxie eine verminderte Differenzierung. Entgegen den Erwartungen findet sich erst bei verlängerter Hypoxiedauer eine Veränderung in der Expression von VEGF, hier allerdings nicht in Form einer Hochregulierung, sondern in einer verminderten Expression im Vergleich zur Normoxie. Diese konträren Ergebnisse können im heterogenen Ausgangsmaterial begründet sein, berücksichtigt man die unterschiedliche Prämedikation bzw. die verschiedenen schweren Krankheitsbilder der Patienten. Die exemplarischen Untersuchungen der HUVEC bzw. der humanen Fibroblasten zeigen ein differierendes Bild, denn sowohl die Stammzellmarker als auch VEGF und Vimentin bei den humanen Fibroblasten werden heraufreguliert (Darstellung 76). Dies bestätigt, dass die untersuchten Stammzellmarker nicht beschränkt sind auf kardiale Progenitorzellen und auch in

anderen Zelltypen einer Regulierung unterliegen. Die qualitativen Unterschiede in den Expressionsmustern können eine Folge der unterschiedlichen Herkunft der Zellen sein.

Messung der Zellverkürzung

Die Zellverkürzungsversuche nach Hypoxie müssen aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz mit Vorsicht interpretiert werden: Die funktionellen Untersuchungen zeigen in den Hypoxiemodellen A und C einen tendenziellen positiven Einfluss der konditionierten Überstände, die einer Hypoxie unterzogen wurden, auf die Zellverkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten. Bei den hier untersuchten Zelllinien ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Normoxie i.d.R. keinen positiven Einfluss im Vergleich zum „Zellkulturmedium nach Trypsinierung“ hat. Im Hypoxiemodell B liegt die Messung der relativen Zellverkürzung des hypoxischen Überstands unter der des normoxischen, wobei der Median der Normoxie vergleichbar ist mit den Modellen A und C. Somit scheint es, dass die Hypoxie keinen positiven Einfluss gehabt hat. Diese heterogenen Befunde sind einmal mehr bezeichnend für die schwierige Reproduzierbarkeit der Zelllinien. Die hier untersuchten Zelllinien könnten somit weniger potente Zellen enthalten haben, als dies bei den Modellen A und C der Fall war. Eine andere Möglichkeit ist jedoch, dass die Hypoxiedauer im Modell B nicht ausreichend war, denn die Messungen des Modells C mit verlängerter Versuchsdauer liefert ähnliche Ergebnisse wie das Modell A.

Dass der Median der Zellverkürzungsmessungen der normoxischen konditionierten Überstände unter dem der hypoxischen Überstände liegt, widerspricht der funktionellen Charakterisierung. Denn hier zeigte sich eine Verbesserung ebendieser Funktion. Am wahrscheinlichsten ist die Ursache hierfür in den bereits beschriebenen heterogenen Ausgangslagen der Patienten zu suchen. Zudem verhalten sich die Zelllinien in Kultur in ihrer Zusammensetzung und Ausprägung variabel. Umso gewichtiger ist der Ausgleich über die Hypoxie zu bewerten, gleichwohl die Untersuchung der Hypoxie induzierten Eigenschaften einer Zellreihe, die schon unter Normoxie einen positiven Einfluss auf die Zellverkürzung zeigt, in allen Modellen wünschenswert gewesen wäre.

Da für die Messung der relativen Zellverkürzung lediglich die konditionierten Überstände verwendet werden, ist davon auszugehen, dass die möglichen Effekte über lösliche Substanzen vermittelt werden. Hier kommen z.B. Zytokine in Frage. Die Vermittlung der positiven Einflüsse könnte auf verschiedenen Mechanismen beruhen: Zum einen könnte im Falle einer Aktivierung über Interleukine wie IL-6 der Jak-STAT-Signaltransduktionsweg und die damit einhergehende Modulation der Transkription verschiedener Gene eine Rolle spielen.¹²⁶ Dass proinflammatorischen Zytokinen kardioprotektive Eigenschaften, wie z.B. die positive Beeinflussung im Ischämie-Reperusionsmodell zugeschrieben werden, zeigen nachfolgend genannte Studien.¹²⁷ Außerdem durchlaufen die Zellen dieses Versuchs nach der Hypoxie eine Reoxygenierung, indem sie nach Beenden der Hypoxie zu den normoxen Kontrollen gestellt werden. Sandin et al. zeigen für ebendiese Versuchsanordnung eine Induktion der Oxygenierung von Tyrosinphosphatasen.¹²⁸

Um zu einer Verbesserung des Zellverkürzungsverhaltens führen zu können, wäre weiterhin neben einer β -adrenergen Stimulierung, die in diesem Falle am ehesten auszuschließen ist, auch eine Optimierung des Kalziumhandlings der Zelle denkbar. Hier käme Phospholamban als Regulator der SERCA und das SERCA/NCX-Verhältnis in Frage, da diese Moleküle für die Verfügbarkeit des Kalziums zur Auslösung des Brückenzyklus entscheidend mitverantwortlich sind.¹²⁹

Wie nachfolgend bzw. in der Einleitung gezeigt, beinhalten die konditionierten Überstände über die Medienkomponenten und über die CFC/CDC eine Vielzahl an Zytokinen, Elektrolyten und pH-sensitiven Komponenten. Eine exakte Herleitung der Beeinflussung aller Faktoren durch die Hypoxie und eine genaue Herleitung des Signaltransduktionsweges ist im Rahmen dieser Studie entsprechend nicht möglich.

Beurteilung der Zytokinprofile

Übereinstimmend zwischen allen untersuchten Zelllinien lassen sich im konditionierten Überstand der Normoxie IL-6 und MMP-1 erhöht nachweisen, jedoch keine deutlichen Veränderungen im Bezug der Hypoxie auf die Normoxie. Dies

¹²⁶ Vgl. Abbas, A. K. et al., Cellular and, 2010.

¹²⁷ Vgl. Lecour, S., Activation of, 2009, S. 32–40; vgl. dazu auch Lecour, S. et al., Identification of, 2002, S. 509–518.

¹²⁸ Vgl. Sandin, A. et al., Hypoxia followed, 2011, S. 820–826.

¹²⁹ Vgl. Bers, D. M., Cardiac excitation-contraction, 2002, S. 198–205.

würde der nicht vorhandenen Signifikanz der Versuche Rechnung tragen. Dennoch besteht Anlass zu weiteren Spekulationen: Die erhöhte Expression der detektierten Zytokine könnte bedeuten, dass diese insbesondere an den negativen Einflüssen der Normoxie auf die in dieser Versuchsanordnung gemessene relative Zellverkürzung ventrikulärer Kardiomyozyten beteiligt sind. Dem widerspricht allerdings die Tatsache, dass ebendiese Zytokine auch in der positiv wirkenden Hypoxie exprimiert sind. Wenn die Rolle eines bestimmten Zytokins eruiert werden soll, muss aber eine Antagonisierungsstudie (Anti-Cytokine-Strategy) durchgeführt oder die Effekte eines Applikationsversuchs untersucht werden. Entscheidend könnte also vielmehr eine bestimmte Zusammensetzung von Zytokinen sein, welche die beobachteten Effekte vermittelt. Dass proinflammatorische Zytokine sowohl positive als auch negative Effekte im Herzen haben können, zeigt die Studie von Wilson et al.¹³⁰

Die Tatsache, dass die humanen Fibroblasten, trotz ihres Ursprungs aus einem anderen Organ als dem Herzen, in der Normoxie dieselben Zytokine erhöht exprimieren, zeigt, dass diese nicht spezifisch für kardiale Progenitorzellen sind und dass dies als weiterer Hinweis auf das Vorliegen einer Mischkultur gewertet werden kann.

Eine weitere Veröffentlichung fasst den parakrinen Einfluss von Stamm- bzw. Progenitorzellen in der Expression von VEGF und der hierüber vermittelten Neovaskularisierung des Gewebes zusammen.¹³¹ Dies konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden: VEGF wurde in keiner der hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert. Möglicherweise könnte eine Variation in der Dauer der Hypoxie zu anderen Ergebnissen führen.

Da sich keine markanten Änderungen im Zytokinprofil zwischen Normoxie und Hypoxie zeigen, bleibt der Signaltransduktionsweg nach wie vor unklar. Betrachtet man die Auflistungen der Zytokine, so fällt auf, dass insbesondere die Interleukine einer hohen Variabilität unterliegen: In der Zelllinie 12 werden vor allem Interleukine erhöht, in der Zelllinie 22 hingegen vermindert. Demnach könnten neben der Zusammensetzung der Zytokine auch andere Faktoren die Zellverkürzung beeinflussen. So z.B. könnte die Expression von ROS in Kombination mit der Induktion des HIF-1 α eine Rolle spielen. Ein anderer Ansatz wäre die Vermutung,

¹³⁰ Vgl. Wilson, E. M. et al., Duality of, 2004, S. 801–811.

¹³¹ Vgl. Burchfield, J. S. et al., Role of, 2008, S. 4.

dass über die Hypoxie negative Effekte der proinflammatorischen Zytokine reduziert und somit eine positiv inotrope Wirkung, z.B. in Form eines verbesserten Kalziumhandlings über das SERCA/NCX-Verhältnis, erzeugt werden könnte. Nicht außer Acht zu lassen ist aber auch hier die heterogene Ausgangssituation und vor allem die Prämedikation der Patienten. Bei der Beurteilung der gemessenen Zytokine ist weiterhin zu beachten, dass Variabilitäten auch aufgrund des Messsystems bzw. der verwendeten Standardisierung zu Stande kommen können.

Welchen Einfluss eine Medikation auf das Herzgewebe und damit die kultivierten Zellen haben könnte und ob diese Effekte nach einer Kultivierungszeit von sechs Wochen noch Auswirkungen haben können, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.4 Schlussfolgerung

Primärkulturen aus humanem Herzgewebe umfassen eine heterogene Population von Zellen, in der kardiale Progenitorzellen nicht eindeutig benannt und angereichert werden können. Trotzdem gibt es Hinweise auf ihre Existenz, sowohl auf morphologischer als auch auf molekularbiologischer Ebene. Humane Fibroblasten und humane Endothelzellen weisen morphologisch und funktionell sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede auf, so dass eine eindeutige Identifizierung der vorhandenen Zellpopulationen nach wie vor kritisch zu betrachten ist. Desweiteren können konditionierte Überstände aus diesen Kulturen einen tendenziellen positiven Einfluss auf die relative Zellverkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten haben, wenn sie zuvor einer Hypoxie unterzogen wurden. Mögliche Ursachen für diese Wirkungen sind nicht eindeutig einem bestimmten Zytokinprofil zuzuordnen.

6. Zusammenfassung

Die Frage nach neuen Therapieformen der Herzinsuffizienz ist zentrales Thema vieler aktueller Studien. Hierbei spielen insbesondere mögliche im Herzen residente Stamm- bzw. Progenitorzellen und ihre parakrinen Wirkungen eine wichtige Rolle. Die Diskussion um die verschiedenen Zellpopulationen, die aus Primärkulturen des Herzens entstehen, entwickelt sich ständig weiter und mit ihr die Kontroversen über Nutzen und Schaden des Einsatzes dieser Zellen im Menschen. Stehen auf der einen Seite die Vorteile einer Therapie mit Zellen des eigenen Körpers, ihrer relativ simplen Vermehrung *in vitro* und damit unkomplizierten Verfügbarkeit für die Therapie, bleiben auf der anderen Seite die Risiken einer tumorösen Entartung, unklarer Charakterisierung und die widersprüchlichen Ergebnisse ihres tatsächlichen Nutzens. In dieser Studie wurden Primärkulturen aus humanen Herzen angelegt und die kultivierten Zellen über ihre Morphologie, PCR, Western Blot, Immunfluoreszenz und funktionelle Eigenschaften, sowie ihrer parakrinen Effekte mit Hilfe von Zytokin-expressionsmustern charakterisiert. Zudem wurde der funktionelle Einfluss konditionierter Überstände unter normoxischen Bedingungen mit Überständen eines hypoxischen Umgebungsmilieus verglichen. Die Ergebnisse beschreiben ein heterogenes Bild: Stamm-/bzw. Progenitorzellen lassen sich nicht selektiv ansprechen, gleichwohl es Hinweise auf ihre Existenz in Form der Bildung von Kardiosphären und dem Nachweis von Stammzellfaktoren auf molekularer Ebene gibt. Vergleichspopulationen humaner Endothelzellen und humaner Fibroblasten belegen die morphologischen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen diesen Populationen und den Zellen aus Primärkulturen, weshalb letztere als Mischkulturen verschiedener (Vorläufer-)zellen angesehen werden müssen. Funktionell scheint ein hypoxisches Umgebungsmilieu der kultivierten Zellen zu einer verbesserten Zellverkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten zu führen. Das Wirkungsprinzip bleibt hierbei unklar. Bei der Untersuchung der Zytokinzusammensetzung der konditionierten Überstände zeigen sich die deutlichsten Unterschiede im Vergleich zwischen Normoxie und Kontrolle in Form der Zytokine EDA-A2, IL-6, IL-8, MCP-1, MMP-1, TIMP1 und TIMP2, nicht jedoch zwischen Hypoxie und Normoxie. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Schwierigkeiten der Definition vorhandener Zellpopulationen und die Notwendigkeit näherer Untersuchungen der den beschriebenen Wirkungen zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege.

Summary

The central theme of many recent studies is how to develop new forms of therapy in chronic heart failure. Stem or progenitor cells and their paracrine effects play a critical role in these treatments especially in case of stem cells which might be resident in the affected heart itself. The controversial discussion as to whether different cell populations arise from primary cultures of heart tissue is still advancing and along with it questions of stem cells being harmful or beneficial in human trials. On the one hand there are advantages to a therapy with host cells, their relatively simple amplification *in vitro* and therefore common availability. On the other hand there exist risks of tumor formation, undefined characterization and contradicting results regarding effects and usefulness of stem cells *in vivo*. In this study outgrowing cells of primary human heart cultures were examined for stem cell and functional characteristics regarding their morphology, PCR, Western Blot, immunofluorescence and measurements of cell shortening. Of additional interest has been their paracrine effects resulting in specific cytokine secretion patterns and the functional influence of conditioned media under normoxic conditions versus conditioned media of cells which underwent hypoxia. The conclusion deduced from these results is heterogeneous: Stem or progenitor cells cannot be identified properly in these cultures. Nevertheless there are hints of their existence regarding the development of cardiospheres and the detection of stem cell markers through PCR. The comparison between cells of primary cultures and human endothelial respectively human fibroblast cells reflects the morphologic and functional similarities and for this reason primary cultures should be regarded as a mixture of different (progenitor) cell types. As a functional criteria hypoxic conditions might lead to an increase in cell shortening of isolated ventricular cardiomyocytes although the signaling pathway remains unknown. The examination of the cytokine production of the different conditioned media shows remarkable differences only between normoxic media and the control group (increase in EDA-A2, IL-6, IL-8, MCP-1, MMP-1, TIMP1 und TIMP2) but not between normoxic and hypoxic conditions. These findings illustrate the difficulties in defining existing cell populations and the necessity for further investigations of underlying signaling pathways.

Literaturverzeichnis

- Abaci, H. E./Truitt, R./Luong, E./Drazer, G./Gerecht, S.** [Adaptation to, 2010]: Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells, in: *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 298, Heft 6, 2010, S. C1527-37, doi:10.1152/ajpcell.00484.2009.
- Abbas, A. K./Lichtman, A. H./Pillai, S.** [Cellular and, 2010]: Cellular and molecular immunology, 6. Aufl., Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010.
- Abbott, J.A.** [Canine and Feline Cardiology, 2008]: Acquired Valvular Disease, in: Tilley, L.P. / Smith, F.W.K./Oyama, M.A. /Sleeper, M.M. [Canine and Feline Cardiology, 2008]: Manual of canine and feline cardiology, 4. Aufl., St Louis (Mo.): Saunders-Elsevier, 2008, S.110.
- Adkins, S./Burmeister, M.** [Visualization of, 1996]: Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations, in: *Anal. Biochem* 240, Heft 1, 1996, S. 17–23.
- Aghila, R., Koippallil, G./Jayakumar, K./Srinivas, G./Nair, R. R./Karthi, C. C.** [Isolation of, 2008]: Isolation of ckit-positive cardiosphere-forming cells from human atrial biopsy, in: *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 16, Heft 1, 2008, S. 50–56.
- Ahuja, P./Sdek, P./MacLellan, W. R.** [Cardiac myocyte, 2007]: Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration, in: *Physiol. Rev* 87, Heft 2, 2007, S. 521–544.
- Ala, Y./Palluy, O./Favero, J./Bonne, C./Modat, G./Dornand, J.** [Hypoxia/reoxygenation, 1992]: Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelial cells to promote interleukin-1 and interleukin-6 production. Effects of free radical scavengers, in: *Agents Actions* 37, Heft 1-2, 1992, S. 134–139.
- Andersen, D. C./Andersen, P./Schneider, M./Jensen, H. B./Sheikh, S. P.** [Murine cardiospheres, 2009]: Murine "cardiospheres" are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential, in: *Stem Cells* 27, Heft 7, 2009, S. 1571–1581, doi:10.1002/stem.72.
- Anversa, P./Nadal-Ginard, B.** [Myocyte renewal, 2002]: Myocyte renewal and ventricular remodelling, in: *Nature* 415, Heft 6868, 2002, S. 240–243, doi:10.1038/415240a.
- Augustin, H. G./Kozian, D. H./Johnson, R. C.** [Differentiation of, 1994]: Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes, in: *Bioessays* 16, Heft 12, 1994, S. 901–906.
- Baltimore, D.** [RNA-dependent DNA, 1970]: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses, in: *Nature* 226, Heft 5252, 1970, S. 1209–1211.
- Barile, L./Messina, E./Giacomello, A./Marbán, E.** [Endogenous cardiac, 2007]: Endogenous cardiac stem cells, in: *Prog Cardiovasc Dis* 50, Heft 1, 2007, S. 31–48, doi:10.1016/j.pcad.2007.03.005.
- Baudino, T. A./Carver, W./Giles, W./Borg, T. K.** [Cardiac fibroblasts, 2006]: Cardiac fibroblasts: friend or foe? in: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 291, Heft 3, 2006, S. H1015-26.
- Beltrami, A. P./Urbanek, K./Kajstura, J./Yan, S. M./Finato, N./Bussani, R./Nadal-Ginard, B./Silvestri, F./Leri, A./Beltrami, C. A./Anversa, P.** [Evidence that, 2001]: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction, in: *N. Engl. J. Med* 344, 2001, Heft 23, S. 1750–1757.
- Bers, D. M.** [Cardiac excitation-contraction, 2002]: Cardiac excitation-contraction coupling, in: *Nature* 415, Heft 6868, 2002, S. 198–205.
- Beutner, E. H.** [Immunofluorescent staining, 1961]: Immunofluorescent staining: the fluorescent antibody method, in: *Bacteriol Rev* 25, Heft 1, 1961, S. 49–76.

- Bird, S. D./Doevendans, P. A./van Rooijen, M. A./La Brutel Riviere, A. de/Hassink, R. J./Passier, R./Mummery, C. L.** [The human, 2003]: The human adult cardiomyocyte phenotype, in: *Cardiovasc. Res* 58, Heft 2, 2003, S. 423–434.
- Bunn, H. F./Poyton, R. O.** [Oxygen sensing, 1996]: Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia, in: *Physiol. Rev* 76, Heft 3, 1996, S. 839–885.
- Burchfield, J. S./Dimmeler, S.** [Role of, 2008]: Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis, in: *Fibrogenesis Tissue Repair* 1, Heft 1, 2008, S. 4.
- Burnette, W. N.** [Western blotting, 1981]: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, in: *Anal. Biochem* 112, Heft 2, 1981, S. 195–203.
- Camelliti, P./Borg, T. K./Kohl, P.** [Structural and, 2005]: Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts, in: *Cardiovasc. Res.* 65, Heft 1, 2005, S. 40–51, doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.020.
- Canfield, A. E./Wren, F. E./Schor, S. L./Grant, M. E./Schor, A. M.** [Aortic endothelial, 1992]: Aortic endothelial cell heterogeneity in vitro. Lack of association between morphological phenotype and collagen biosynthesis, in: *J. Cell. Sci* 102, Pt 4, 1992, S. 807–814.
- Chomczynski, P./Sacchi, N.** [Single-step method, 1987]: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, in: *Analytical Biochemistry* 162, Heft 1, 1987, S. 156–159, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2).
- Cines, D. B./Pollak, E. S./Buck, C. A./Loscalzo, J./Zimmerman, G. A./McEver, R. P./Pober, J. S./Wick, T. M./Konkle, B. A./Schwartz, B. S./Barnathan, E. S./McCrae, K. R./Hug, B. A./Schmidt, A. M./Stern, D. M.** [Endothelial cells, 1998]: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders, in: *Blood* 91, Heft 10, 1998, S. 3527–3561.
- Coons, A. H.** [Fluorescent antibody, 1958]: Fluorescent antibody methods, in: *Gen Cytochem Methods* 1, 1958, S. 399–422.
- Dahme, E. / Kitt, T. / Schulz, L.-C. (Hrsg.)** [Allgemeine Pathologie, 1990]: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin, 10. Aufl., Stuttgart: Enke, 1990.
- Davis, D. R./Zhang, Y./Smith, R. R./Cheng, K./Terrovitis, J./Malliaras, K./Li, T.-S./White, A./Makkar, R./Marbán, E.** [Validation of, 2009]: Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue, in: *PLoS ONE* 4, Heft 9, 2009, S. e7195, doi:10.1371/journal.pone.0007195.
- Davis, D. R./Kizana, E./Terrovitis, J./Barth, A. S./Zhang, Y./Smith, R. R./Miake, J./Marbán, E.** [Isolation and, 2010]: Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies, in: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, Heft 2, 2010, S. 312–321, doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.019.
- DFG - Deutsche Forschungsgemeinschaft** [DFG Deutsche, 2011]: Was sind Stammzellen ?, www.dfg.de/dfg_magazin/forschungspolitik_standpunkte_perspektiven/stammzellforschung/was_sind_stammzellen/index.html, 14. Jun. 2011.
- Drenckhahn, D. (Hrsg.)** [Anatomie, 2003]: Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1, 16. Aufl., München, Jena: Urban und Fischer, 2003.
- Drenckhahn, D.** [Zellenlehre, 2003]: Zellenlehre, in: Drenckhahn, D. (Hrsg.) [Anatomie, 2003]: Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1, 16. Aufl., München, Jena: Urban und Fischer, 2003, S. 9-91.
- Drenckhahn, D.** [Gewebelehre, 2003]: Allgemeine Gewebelehre, in: Drenckhahn, D. (Hrsg.) [Anatomie, 2003]: Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1, 16. Aufl., München, Jena: Urban und Fischer, 2003, S. 93-207.

- Duranteau, J./Chandel, N. S./Kulisz, A./Shao, Z./Schumacker, P. T.** [Intracellular signaling, 1998]: Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes, in: *J. Biol. Chem* 273, Heft 19, 1998, S. 11619–11624.
- Engel, F. B.** [Cardiomyocyte proliferation, 2005]: Cardiomyocyte proliferation: a platform for mammalian cardiac repair, in: *Cell Cycle* 4, Heft 10, 2005, S. 1360–1363.
- Farmer, B. B./Mancina, M./Williams, E. S./Watanabe, A. M.** [Isolation of, 1983]: Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat hearts: review of the literature and description of a method, in: *Life Sci* 33, Heft 1, 1983, S. 1–18.
- Filippis, L. (de)/Delia, D.** [Hypoxia in, 2011]: Hypoxia in the regulation of neural stem cells, in: *Cell. Mol. Life Sci* 68, Heft 17, 2011, S. 2831–2844.
- Fleming, J.M./Creevy, K.E./Promislow, D.E.L** [Mortality in, 2011]: Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death, in: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, Heft 2, 2011, S. 187–198.
- Freshney, R. I.** [Culture of, 2010]: Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications: 6. Aufl., Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, 2010.
- Freshney, R. I./Goann, S.-R.** [Tierische Zellkulturen, 1990]: Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch, Berlin, New York: de Gruyter, 1990.
- Fries, K. M./Blieden, T./Looney, R. J./Sempowski, G. D./Silvera, M. R./Willis, R. A./Phipps, R. P.** [Evidence of, 1994]: Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis, in: *Clin. Immunol. Immunopathol* 72, Heft 3, 1994, S. 283–292.
- Gimbrone, M. A.** [Human vascular, 1974]: Human vascular endothelial cells in culture: Growth and DNA Synthesis, in: *The Journal of Cell Biology* 60, Heft 3, 1974, S. 673–684.
- Gnecchi, M./Zhang, Z./Ni, A./Dzau, V. J.** [Paracrine mechanisms, 2008]: Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy, in: *Circ. Res.* 103, Heft 11, 2008, S. 1204–1219, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176826.
- Goldberg, M. P./Choi, D. W.** [Combined oxygen, 1993]: Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury, in: *J. Neurosci* 13, Heft 8, 1993, S. 3510–3524.
- Golenhofen, K.** [Basislehrbuch Physiologie, 2006]: Basislehrbuch Physiologie: Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten; 4. Aufl., München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer, 2006.
- Guillemin, K./Krasnow, M. A.** [The hypoxic, 1997]: The hypoxic response: huffing and HIFing, in: *Cell* 89, Heft 1, 1997, S. 9–12.
- Guzy, R. D./Schumacker, P. T.** [Oxygen sensing, 2006]: Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia, in: *Exp. Physiol* 91, Heft 5, 2006, S. 807–819.
- Gwathmey, J. K./Yerevanian, A. I./Hajjar, R. J.** [Cardiac gene, 2011]: Cardiac gene therapy with SERCA2a: from bench to bedside, in: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, Heft 5, 2011, S. 803–812, doi:10.1016/j.jmcc.2010.11.011.
- Hasenfuss, G./Pieske, B.** [Calcium cycling, 2002]: Calcium cycling in congestive heart failure, in: *J. Mol. Cell. Cardiol* 34, Heft 8, 2002, S. 951–969.
- Hayward, G. S./Smith, M. G.** [The chromosome, 1972]: The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis, in: *J. Mol. Biol* 63, Heft 3, 1972, S. 383–395.
- Heim, M. H.** [The Jak-STAT, 1996]: The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus, in: *Eur. J. Clin. Invest* 26, 1996, Heft 1, S. 1–12.

- Heinrich P.C./Schaper, F./Timmermann, A./Martens, A.S./Lehmann, U.** [Zytokine, 2005]: Endokrine Funktionen II: Zytokine, in: Löffler, G./Petrides, P.E. [Biochemie und, 2005]: Biochemie und Pathobiochemie, 7. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer, 2005, S. 813-835.
- Hofmann, K./Titus, G./Montibeller, J. A./Finn, F. M.** [Avidin binding, 1982]: Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogues, in: Biochemistry 21, Heft 5, 1982, S. 978–984.
- Hughes, S.** [Cardiac stem, 2002]: Cardiac stem cells, in: J. Pathol 197, Heft 4, 2002, S. 468–478.
- Janeway, C. A./Travers, P./Walport, M./Shlomchik, M.** [Immunologie, 2002]: Immunologie, 5. Aufl., Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl., 2002.
- Jiang, B. H./Semenza, G. L./Bauer, C./Marti, H. H.** [Hypoxia-inducible factor, 1996]: Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension, in: Am. J. Physiol 271, Heft 4, Pt1, 1996, S. C1172-80.
- Jopling, C./Boue, S./Izpisua Belmonte, J. C.** [Dedifferentiation, transdifferentiation, 2011]: Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration, in: Nat. Rev. Mol. Cell Biol 12, Heft 2, 2011, S. 79–89.
- Kakkar, R./Lee, R. T.** [Intramyocardial fibroblast, 2010]: Intramyocardial fibroblast myocyte communication, in: Circ. Res 106, Heft 1, 2010, S. 47–57.
- Kienle, R.D.** [Canine and Feline Cardiology, 2008]: Feline Cardiomyopathy, in: Tilley, L.P. / Smith, F.W.K./Oyama, M.A. /Sleeper, M.M. [Canine and Feline Cardiology, 2008]: Manual of canine and feline cardiology, 4. Aufl., St Louis (Mo.): Saunders-Elsevier, 2008, S.151-157.
- Klinke, R./Silbernagl, S.(Hrsg.)** [Physiologie, 2003]: Lehrbuch der Physiologie, 4. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2003.
- Knecht, D. A./Dimond, R. L** [Visualization of, 1984]: Visualization of antigenic proteins on Western blots, in: Analytical Biochemistry 136, Heft 1, 1984, S. 180–184, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90321-X](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(84)90321-X).
- Köhler, H.** [Allgemeine Pathologie, 1990]: Erneuerung von Geweben (Regeneration), in: Dahme, E. / Kitt,T. / Schulz, L.-C. (Hrsg.) [Allgemeine Pathologie, 1990]: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin: 10. Aufl., Stuttgart: Enke, 1990, S. 344-360.
- Koumas, L./King, A. E./Critchley, H. O./Kelly, R. W./Phipps, R. P.** [Fibroblast heterogeneity, 2001]: Fibroblast heterogeneity: existence of functionally distinct Thy 1(+) and Thy 1(-) human female reproductive tract fibroblasts, in: Am. J. Pathol. 159, Heft 3, 2001, S. 925–935.
- Krenning, G./Zeisberg, E. M./Kalluri, R.** [The origin, 2010]: The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis, in: J. Cell. Physiol. 225, Heft 3, 2010, S. 631–637, doi:10.1002/jcp.22322.
- Krenz, M./Robbins, J.** [Impact of, 2004]: Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress, in: J. Am. Coll. Cardiol 44, Heft 12, 2004, S. 2390–2397.
- Kusumoto, M./Dux, E./Paschen, W./Hossmann, K. A.** [Susceptibility of, 1996]: Susceptibility of hippocampal and cortical neurons to argon-mediated in vitro ischemia, in: J. Neurochem 67, Heft 4, 1996, S. 1613–1621.
- Kuznetsov, A. V./Kehrer, I./Kozlov, A. V./Haller, M./Redl, H./Hermann, M./Grimm, M./Troppmair, J.** [Mitochondrial ROS, 2011]: Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods, in: Anal Bioanal Chem 400, Heft 8, 2011, S. 2383–2390.
- Kyhse-Andersen, J.** [Electroblotting of, 1984]: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, in: J. Biochem. Biophys. Methods 10, Heft 3-4, 1984, S. 203–209.

- Laemmli, U.K** [Cleavage of, 1970]: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, in: *Nature* 227, Heft 5259, 1970, S. 680-685.
- Langer, M.** [Mechanism of, 2003]: Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive forcefrequency relationship, in: *Pflügers Archiv*, Vol 447, Pt 3, 2003, S. 289-297.
- Lecour, S.** [Activation of, 2009]: Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? in: *J. Mol. Cell. Cardiol* 47, Heft 1, 2009, S. 32-40.
- Lecour, S./Smith, R. M./Woodward, B./Opie, L. H./Rochette, L./Sack, M. N.** [Identification of, 2002]: Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection, in: *J. Mol. Cell. Cardiol* 34, Heft 5, 2002, S. 509-518.
- Lee, J.-W./Bae, S.-H./Jeong, J.-W./Kim, S.-H./Kim, K.-W.** [Hypoxia-inducible factor, 2004]: Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions, in: *Exp. Mol. Med* 36, Heft 1, 2004, S. 1-12.
- Lehnart, S. E./Maier, L. S./Hasenfuss, G.** [Abnormalities of, 2009]: Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart, in: *Heart Fail Rev* 14, Heft 4, 2009, S. 213-224, doi:10.1007/s10741-009-9146-x.
- Liebich, H.-G.** [Funktionelle Histologie, 1999]: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, 3. Aufl., Stuttgart, New York: Schattauer, 1999.
- Liebich, H.-G.** [Kreislaufsystem, 1999]: Kreislaufsystem (Systema cardiovasculare et lymphovasculare), in: Liebich, H.-G. [Funktionelle Histologie, 1999]: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, 3. Aufl., Stuttgart, New York: Schattauer, 1999, S.118-131.
- Liemburg-Apers, D. C./Imamura, H./Forkink, M./Nooteboom, M./Swarts, H. G./Brock, R./Smeitink, J. A. M./Willems, P. H. G. M./Koopman, W. J. H.** [Quantitative Glucose, 2011]: Quantitative Glucose and ATP Sensing in Mammalian Cells, in: *Pharmaceutical research*, 2011.
- Lin, Y./Huang, R./Chen, L.-P./Lisoukov, H./Lu, Z.-H./Li, S./Wang, C. C./Huang, R.-P.** [Profiling of, 2003]: Profiling of cytokine expression by biotin-labeled-based protein arrays, in: *Proteomics* 3, Heft 9, 2003, S. 1750-1757.
- Löffler, G./Petrides, P.E.** [Biochemie und, 2005]: Biochemie und Pathobiochemie, 7. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer, 2005.
- Löffler, G.** [chemische Kommunikation, 2005]: Endokrine Funktionen I: Regulation durch chemische Kommunikation zwischen Zellen, in: Löffler, G./Petrides, P.E. [Biochemie und, 2005]: Biochemie und Pathobiochemie, 7. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer, 2005, S. 789-811.
- Lopez-Barneo, J./Pardal, R./Ortega-Sáenz, P.** [Cellular mechanism, 2001]: Cellular mechanism of oxygen sensing, in: *Annu. Rev. Physiol* 63, 2001, S. 259-287.
- Loppnow, H.** [Zytokine: Klassifikation, 2001]: Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen, in: *Der Internist*, 2001, S. 13-27.
- Lowry, O. H./Rosebrough, N. J./Farr, A. L./Randall, R. J.** [Protein measurement, 1951]: Protein measurement with the Folin phenol reagent, in: *J. Biol. Chem* 193, Heft1, 1951, S. 265-275.
- Maxeiner, H./Krehbiehl, N./Müller, A./Woitasky, N./Akintürk, H./Müller, M./Weigand, M.A./Abdallah, Y./Kasseckert, S./Schreckenberger, R./Schlüter, K.-D./Wenzel, S.** [New insights, 2010]: New insights into paracrine mechanisms of human cardiac progenitor cells, in: *Eur. J. Heart Fail* 12, Heft 7, 2010, S. 730-737.

- Messina, E./Angelis, L. (de)/Frati, G./Morrone, S./Chimenti, S./Fiordaliso, F./Salio, M./Battaglia, M./Latronico, M. V. G./Coletta, M./Vivarelli, E./Frati, L./Cossu, G./Giacomello, A.** [Isolation and, 2004]: Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart, in: *Circ. Res.* 95, Heft 9, 2004, S. 911–921, doi:10.1161/01.RES.0000147315.71699.51.
- Miltenyi, S./Müller, W./Weichel, W./Radbruch, A.** [High gradient, 1990]: High gradient magnetic cell separation with MACS, in: *Cytometry* 11, Heft 2, 1990, S. 231–238.
- Minuth, W. W./Strehl, R./Schumacher, K.** [Von der Zellkultur, 2002]: Von der Zellkultur zum Tissue engineering, Lengerich: Pabst, 2002.
- Molkentin, J. D./Lin, Q./Duncan, S. A./Olson, E. N.** [Requirement of, 1997]: Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis, in: *Genes Dev* 11, Heft 8, 1997, S. 1061–1072.
- Morgan, J. P./Erny, R. E./Allen, P. D./Grossman, W./Gwathmey, J. K.** [Abnormal intracellular, 1990]: Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure, in: *Circulation* 81, Heft 2 Suppl, 1990, S. III21-32.
- Morrison, S. J./Shah, N. M./Anderson, D. J.** [Regulatory Mechanisms, 1997]: Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology, in: *Cell* 88, Heft 3, 1997, S.287-298.
- Mulisch, M/Welsch U. (Hrsg.)** [Romeis Mikroskopische, 2010]: Romeis Mikroskopische Technik, 18. Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010.
- Mullis, K./Faloona, F./Scharf, S./Saiki, R./Horn, G./Erllich, H.** [Specific enzymatic, 1986]: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, in: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 51, Pt 1, 1986, S. 263–273.
- Nilsen, E. M./Johansen, F. E./Jahnsen, F. L./Lundin, K. E./Scholz, T./Brandtzaeg, P./Haraldsen, G.** [Cytokine profiles, 1998]: Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine, in: *Gut* 42, Heft 5, 1998, S. 635–642.
- Noort, W. A./Sluijter, J. P. G./Goumans, M.-J./Chamuleau, S. A. J./Doevendans, P. A.** [Stem cells, 2009]: Stem cells from in- or outside of the heart: isolation, characterization, and potential for myocardial tissue regeneration, in: *Pediatr Cardiol* 30, Heft 5, 2009, S. 699–709, doi:10.1007/s00246-008-9370-5.
- Ottaviano, F. G./Yee, K. O.** [Communication signals, 2011]: Communication signals between cardiac fibroblasts and cardiac myocytes, in: *J. Cardiovasc. Pharmacol* 57, Heft 5, 2011, S. 513–521.
- Owen, C. S./Sykes, N. L.** [Magnetic labeling, 1984]: Magnetic labeling and cell sorting, in: *J. Immunol. Methods* 73, Heft 1, 1984, S. 41–48.
- Oyama, M. A.** [Canine and Feline Cardiology, 2008]: Canine Cardiomyopathy, in: Tilley, L.P. / Smith, F.W.K./Oyama, M.A. /Sleeper, M.M. [Canine and Feline Cardiology, 2008]: Manual of canine and feline cardiology, 4. Aufl., St Louis (Mo.): Saunders-Elsevier, 2008, S.139.
- Peiper, U.** [Muskulatur, 2003]: Muskulatur, in: *Klinke, R./Silbernagl, S.(Hrsg.) [Physiologie, 2003]: Lehrbuch der Physiologie*, 4. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2003, S. 81-108.
- Piper, H. M./Probst, I./Schwartz, P./Hütter, F. J./Spieckermann, P. G.** [Culturing of, 1982]: Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes, in: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 14, Heft 7, 1982, S. 397–412.
- Piper, H. M./Millar, B. C./McDermott, B. J.** [The negative, 1989]: The negative inotropic effect of neuropeptide Y on the ventricular cardiomyocyte, in: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 340, Heft 3, 1989, S. 333–337.
- Piper, H. M./Jacobson, S. L./Schwartz, P.** [Determinants of, 1988]: Determinants of cardiomyocyte development in long-term primary culture, in: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 20, Heft 9, 1988, S. 825–835, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2828\(88\)80007-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2828(88)80007-5).

- Pouly, J./Bruneval, P./Mandet, C./Proksch, S./Peyrard, S./Amrein, C./Bousseaux, V./Guillemain, R./Deloche, A./Fabiani, J.-N./Menasché, P.** [Cardiac stem, 2008]: Cardiac stem cells in the real world, in: *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 135, Heft 3, 2008, S. 673–678.
- Pulkki, K. J.** [Cytokines and, 1997]: Cytokines and cardiomyocyte death, in: *Ann. Med* 29, Heft 4, 1997, S. 339–343.
- Ramírez, G./Hagood, J. S./Sanders, Y./Ramírez, R./Becerril, C./Segura, L./Barrera, L./Selman, M./Pardo, A.** [Absence of, 2011]: Absence of Thy-1 results in TGF- β induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts, in: *Lab Invest* 91, Heft 8, 2011, S.1206-1218.
- Rubart, M./Field, L. J.** [Cardiac regeneration, 2006]: Cardiac regeneration: repopulating the heart, in: *Annu. Rev. Physiol* 68, 2006, S. 29–49.
- Rumsey, W. L./Pawlowski, M./Lejavardi, N./Wilson, D. F.** [Oxygen pressure, 1994]: Oxygen pressure distribution in the heart in vivo and evaluation of the ischemic "border zone", in: *Am. J. Physiol* 266, Heft 4, Pt 2, 1994, S. H1676-80.
- Sandin, A./Dagnell, M./Gonon, A./Pernow, J./Stangl, V./Aspenström, P./Kappert, K./Ostman, A.** [Hypoxia followed, 2011]: Hypoxia followed by re-oxygenation induces oxidation of tyrosine phosphatases, in: *Cell. Signal* 23, Heft 5, 2011, S. 820–826.
- Scheid, P.** [Atmung, 2003]: Atmung, in: *Klinke, R./Silbernagl, S.* (Hrsg.) [Physiologie, 2003]: Lehrbuch der Physiologie, 4. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2003, S. 217-286.
- Schindler, C./Darnell, J. E.** [Transcriptional responses, 1995]: Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway, in: *Annu. Rev. Biochem* 64, 1995, S. 621–651.
- Schlesinger, J./Schueler, M./Grunert, M./Fischer, J. J./Zhang, Q./Krueger, T./Lange, M./Tönjes, M./Dunkel, I./Sperling, S. R.** [The cardiac, 2011]: The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs, in: *PLoS Genet* 7, Heft 2, 2011, S. e1001313.
- Schlüter, K.-D./Schreiber, D.** [Adult ventricular, 2005]: Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture, in: *Methods Mol. Biol.* 290, 2005, S. 305–314.
- Schrader, J.** [Das Herz, 2003]: Das Herz, in: *Klinke, R./Silbernagl, S.* (Hrsg.) [Physiologie, 2003]: Lehrbuch der Physiologie, 4. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2003, S. 109-144.
- Schwartz, S. M.** [Selection and, 1978]: Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells, in: *In Vitro* 14, Heft 12, 1978, S. 966–980.
- Shah, A. M.** [Paracrine modulation, 1996]: Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells, in: *Cardiovasc. Res* 31, Heft 6, 1996, S. 847–867.
- Shapiro, A.L./Vinuela, E./V. Maizel, J.** [Molecular weight, 1967]: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, in: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28, 1967, Heft 5, S. 815–820, [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90391-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(67)90391-9).
- Shoji, S./Rickard, K. A./Ertl, R. F./Linder, J./Rennard, S. I.** [Lung fibroblasts, 1989]: Lung fibroblasts produce chemotactic factors for bronchial epithelial cells, in: *Am. J. Physiol* 257, Heft 2, Pt 1, 1989, S. L71-9.
- Smart, N./Riley, P. R.** [The Stem, 2008]: The Stem Cell Movement, in: *Circulation Research* 102, Heft 10, 2008, S. 1155–1168.
- Smith, G.** [Willard Boyle, 2011]: Willard Boyle, in: *Nature* 474, Heft 7349, 2011, S.37

- Smith, P.K./Krohn, R.I./Hermanson, G.T./Mallia, A.K./Gartner, F.H./Provenzano, M.D./Fujimoto, E.K./Goeke, N.M./Olson, B.J./Klenk, D.C** [Measurement of, 1985]: Measurement of protein using bicinchoninic acid, in: *Analytical Biochemistry* 150, Heft 1, 1985, S. 76–85, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Smith, R. S./Smith, T. J./Blieden, T. M./Phipps, R. P.** [Fibroblasts as, 1997]: Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation, in: *Am. J. Pathol* 151, Heft 2, 1997, S. 317–322.
- Smithies, O.** [An improved, 1959]: An improved procedure for starch-gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals, in: *Biochem. J* 71, Heft 3, 1959, S. 585–587.
- Smits, A. M./van Vliet, P./Metz, C. H./Korfage, T./Sluijter, J. Pg/Doevendans, P. A./Goumans, M.-J.** [Human cardiomyocyte, 2009]: Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology, in: *Nat Protoc* 4, Heft 2, 2009, S. 232–243, doi:10.1038/nprot.2008.229.
- Souders, C. A./Bowers, S. L. K./Baudino, T. A.** [Cardiac fibroblast, 2009]: Cardiac fibroblast: the renaissance cell, in: *Circ. Res* 105, Heft 12, 2009, S. 1164–1176.
- Southern, E. M.** [Detection of, 1975]: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, in: *J. Mol. Biol* 98, Heft 3, 1975, S. 503–517.
- Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn (Hrsg.)** [Todesursachenstatistik, 2011]: Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10, Sep. 2011, www.gbe-bund.de, [Suchfunktion: Todesursachenstatistik, Link: Tabellen] 30. Sep. 2011.
- Stephanou, A./Brar, B./Heads, R./Knight, R. D./Marber, M. S./Pennica, D./Latchman, D. S.** [Cardiotrophin-1 induces, 1998]: Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli, in: *J. Mol. Cell. Cardiol* 30, Heft 4, 1998, S. 849–855.
- Strutz, F./Okada, H./Lo, C.W./Danoff, T./Carone, R.L./Tomaszewski, J.E./Neilson, E.G.** [Identification and, 1995]: Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1, in: *J. Cell. Biol.* 130, Heft 2, 1995, S. 393–405.
- Sumpio, B. E./Riley, J. T./Dardik, A.** [Cells in focus, 2002]: Cells in focus: endothelial cell, in: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34, Heft 12, 2002, S. 1508–1512.
- Tilley, L.P. / Smith, F.W.K./Oyama, M.A. /Sleeper, M.M.** [Canine and Feline Cardiology, 2008]: Manual of canine and feline cardiology, 4. Aufl., St Louis (Mo.): Saunders-Elsevier, 2008, S.110–157.
- Towbin, H./Staehelin, T./Gordon, J.** [Electrophoretic transfer, 1979]: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, in: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76, Heft 9, 1979, S. 4350–4354.
- Tsuruda, T./Costello-Boerrigter, L. C./Burnett, John C.** [Matrix metalloproteinases, 2004]: Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules, in: *Heart Fail Rev* 9, Heft 1, 2004, S. 53–61.
- Turrens, J. F.** [Mitochondrial formation, 2003]: Mitochondrial formation of reactive oxygen species, in: *J. Physiol. (Lond.)* 552, Pt 2, 2003, S. 335–344.
- van Vliet, P./Roccio, M./Smits, A. M./van Oorschot, A. A. M./Metz, C. H. G./van Veen, T. A. B./Sluijter, J. P. G./Doevendans, P. A./Goumans, M.-J** [Progenitor cells, 2008]: Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy, in: *Neth Heart J* 16, Heft 5, 2008, S. 163–169.
- Vliegen, H. W./van der Laarse, A./Cornelisse, C. J./Eulderink, F.** [Myocardial changes, 1991]: Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation, in: *Eur. Heart J* 12, Heft 4, 1991, S. 488–494.

- Volz, A./Piper, H. M./Siegmund, B./Schwartz, P.** [Longevity of, 1991]: Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture, in: J. Mol. Cell. Cardiol. 23, Heft 2, 1991, S. 161–173.
- Wieland, T.** [Peptides of, 1986]: Peptides of poisonous Amanita mushrooms, New York: Springer-Verlag, 1986.
- Wilson, E. M./Diwan, A./Spinale, F. G./Mann, D. L.** [Duality of, 2004]: Duality of innate stress responses in cardiac injury, repair, and remodeling, in: J. Mol. Cell. Cardiol 37, Heft 4, 2004, S. 801–811.
- Winegrad, S./Henrion, D./Rappaport, L./Samuel, J. L.** [Self-protection by, 1999]: Self-protection by cardiac myocytes against hypoxia and hyperoxia, in: Circ. Res 85, Heft 8, 1999, S. 690–698.
- Wörterbuch-Redaktion Walter de Gruyter GmbH&Co.KG (Hrsg.)** [Pschyrembel, 2002]: Pschyrembel klinisches Wörterbuch: 259. Aufl., Berlin: de Gruyter, 2002.
- Wörterbuch-Redaktion Walter de Gruyter GmbH&Co.KG (Hrsg.)** [Pschyrembel, 2002]: Stichwort: „Endothel“, in: Pschyrembel klinisches Wörterbuch: 259. Aufl., Berlin: de Gruyter, 2002, S.466.
- Wollert, K. C./Drexler, H.** [The role, 2001]: The role of interleukin-6 in the failing heart, in: Heart Fail Rev 6, Heft 2, 2001, S. 95–103.
- World Health Organization (Hrsg.)** [WHO Cardiovascular, 2011]: WHO Cardiovascular diseases (CVDs), Sep. 2011, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html, 30. Sep. 2011.
- Yokoyama, Y./Beckman, J. S./Beckman, T. K./Wheat, J. K./Cash, T. G./Freeman, B. A./Parks, D. A.** [Circulating xanthine, 1990]: Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury, in: Am. J. Physiol 258, Heft 4, Pt 1, 1990, S. G564-70.
- Zaglia, T./Dedja, A./Candiotto, C./Cozzi, E./Schiaffino, S./Ausoni, S.** [Cardiac interstitial, 2009]: Cardiac interstitial cells express GATA4 and control dedifferentiation and cell cycle re-entry of adult cardiomyocytes, in: J. Mol. Cell. Cardiol 46, Heft 5, 2009, S. 653–662, doi:10.1016/j.yjmcc.2008.12.010.
- Zeisberg, E. M./Tarnavski, O./Zeisberg, M./Dorfman, A. L./McMullen, J. R./Gustafsson, E./Chandraker, A./Yuan, X./Pu, W. T./Roberts, A. B./Neilson, E. G./Sayegh, M. H./Izumo, S./Kalluri, R.** [Endothelial-to-mesenchymal transition, 2007]: Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis, in: Nat. Med 13, Heft 8, 2007, S. 952–961.
- Zernike, F.** [How I, 1955]: How I discovered phase contrast, in: Science 121, 1955, Heft 3141, S. 345–349.

Erklärung

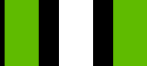
Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, im November 2011

Sandra Scheufen

Danksagung

Mein Dank gilt Sibylle Wenzel und Hagen Maxeiner für die Bereitstellung des Themas sowie Herrn Prof. Roth und Herrn Prof. Schlüter für die freundliche Unterstützung. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Nadine Woitasky, Rolf Schreckenberger, Peter Volk und Daniela Schreiber für die kompetente Beratung und die freundschaftliche Hilfe und bei meinen Kolleginnen und Kollegen Pia Weber, Svenja Forst und Manuel Rebelo. Desweiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie und den Mitarbeitern der AG um Prof. Dr. Konstantin Mayer, Innere Medizin, FB11. Abschließend möchte ich auch Herrn Christian Volz, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, meinen Dank für die Einblicke in seine Arbeit aussprechen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5870-8



9 783835 195870 8